

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II



Dipartimento di Agraria

DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA E  
AGROCHIMICA

XXVIII CICLO

---

**INTERAZIONI INSETTO-PIANTA:**  
***APHIS GOSSYPHII* GLOVER E *CUCURBITA PEPO* L.**

TUTOR: Prof.ssa Maria Cristina Digilio  
CO-TUTOR: Dott. Massimo Giorgini  
COORDINATORE: Prof. Domenico Carputo

DOTTORANDO:  
Dott.ssa Elena Manco

---

2013-2017

# Sommario

<b>1. RIASSUNTO .....</b>	<b>4</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>3.INTRODUZIONE .....</b>	<b>8</b>
3.1 LE INTERAZIONI TRA GLI INSETTI E LE PIANTE .....	8
3.2 LE INTERAZIONI TRA GLI AFIDI E LA PIANTA .....	9
3.3 <i>APHIS GOSSYPYII</i> GLOVER .....	10
3.4 LO ZUCCHINO VARIETÀ SAN PASQUALE .....	12
3.5 SCOPO DELLA TESI.....	13
<b>4. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>14</b>
4.1 DETERMINAZIONE DELLA SPECIE <i>APHIS GOSSYPYII</i> GLOVER .....	14
4.2 ALLEVAMENTO DI PIANTE E AFIDI .....	16
4.3 RACCOLTA DELLE GHIANDOLE SALIVARI.....	18
4.4 RACCOLTA DELLA SALIVA .....	20
4.5 ANALISI TRASCRITTOMICA DELLE GHIANDOLE SALIVARI E PROTEOMICA DELLA SALIVA .....	23
4.5.2 ANALISI PROTEOMICA DELLE PROTEINE SALIVARI .....	25
4.6 INTERAZIONI TRA LO ZUCCHINO SAN PASQUALE E <i>APHIS GOSSYPYII</i> .....	26
4.6.1 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI <i>A. GOSSYPYII</i> – INFESTAZIONE CONTROLLATA.....	27
4.6.1.1 Fertilità .....	27
4.6.1.2 Fertilità e comportamento di dispersione delle progenie.....	27
4.6.1.3 Durata dello sviluppo, fertilità e comportamento di dispersione della progenie .....	28
4.6.2 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI <i>A. GOSSYPYII</i> – TRATTAMENTO CON SALIVA.....	28
4.6.2.1 Durata dello sviluppo, fertilità e comportamento di dispersione della progenie .....	29
4.6.2.2 Fertilità e comportamento di dispersione della progenie .....	30
La .....	30
4.6.3 FERTILITÀ E COMPORTAMENTO DI DISPERSIONE DELLA PROGENIE - RISPOSTA SISTEMICA. ....	30
4.6.4. ANALISI STATISTICA.....	31
4.6.5 ANALISI DELLA RISPOSTA DELLO ZUCCHINO ALL'ATTACCO DEGLI AFIDI .....	31
4.6.5.1 Infestazione controllata di <i>A. gossypii</i> .....	31
4.6.5.2 Analisi di espressione RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) .....	32
4.6.5.3 Estrazione RNA da foglia .....	32

4.6.5.4 Quantificazione dell'RNA .....	33
4.6.5.5 Trattamento con DNAsi .....	34
4.6.5.6 Sintesi del cDNA .....	35
4.6.5.7 Controllo della sintesi del cDNA.....	35
4.6.5.8 Real Time RT-PCR .....	36
<b>5. RISULTATI.....</b>	<b>38</b>
5.1 DETERMINAZIONE DELLA SPECIE <i>APHIS GOSSYPHII</i> GLOVER .....	38
5.2 ANALISI TRASCRITTOMICA E PROTEOMICA DELLE GHIANDOLE SALIVARI E DELLA SALIVA .....	38
5.2.1 RACCOLTA GHIANDOLE SALIVARI .....	38
5.2.2 RACCOLTA DELLA SALIVA DI <i>APHIS GOSSYPHII</i> .....	39
5.2.3 GHIANDOLE SALIVARI: ASSEMBLAGGIO DEL CDNA E TRASCRITTOMA .....	41
5.2.4 IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE SALIVARI.....	45
5.3 INTERAZIONI TRA LO ZUCCHINO SAN PASQUALE E <i>APHIS GOSSYPHII</i> .....	50
5.3.1 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI <i>A. GOSSYPHII</i> – INFESTAZIONE CONTROLLATA.....	50
5.3.1.1 Fertilità .....	50
5.3.1.2 Comportamento di dispersione della progenie .....	50
5.3.1.3 Durata dello sviluppo .....	51
5.3.2 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI <i>A. GOSSYPHII</i> – TRATTAMENTO CON SALIVA.....	51
5.3.2.1 Durata dello sviluppo, fertilità e comportamento di dispersione della progenie .....	51
5.3.2.2 Biosaggi per la misurazione della performance biologica di <i>A. gossypii</i> – confronto tra trattamento con saliva e infestazione controllata .....	53
5.3.2.3 Biosaggi per la misurazione della performance biologica di <i>A. gossypii</i> -risposta sistemica.....	54
5.4 RISPOSTA DELLA PIANTA DI ZUCCHINO AD INFESTAZIONI CONTROLLATE DI <i>A. GOSSYPHII</i> .....	56
<b>6. DISCUSSIONE.....</b>	<b>61</b>
6.1 LA SPECIE.....	61
6.2 ANALISI TRASCRITTOMICA E PROTEOMICA DELLA SALIVA.....	61
6.3 INTERAZIONE TRA <i>APHIS GOSSYPHII</i> E LO ZUCCHINO SAN PASQUALE.....	64
<b>7. CONCLUSIONI.....</b>	<b>67</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>69</b>

## 1. RIASSUNTO

Lo studio dei meccanismi che regolano le interazioni tra piante e insetti fitofagi rappresenta un interessante campo di ricerca, relativamente nuovo rispetto allo studio delle interazioni tra piante e patogeni. L'alimentazione degli insetti fitofagi causa la produzione endogena di elicitori di risposte della pianta, così come il rilascio di secrezioni da parte dell'insetto, anch'esse coinvolte nell'induzione di risposte della pianta. La presente tesi di dottorato rappresenta un contributo alla conoscenza del ruolo della saliva degli afidi nell'induzione della risposta della pianta di zucchini (*Cucurbita pepo* L.) all'attacco dell'afide del cotone, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). Questa specie è stata raccolta in campo su alcune piante ospiti e la popolazione con il più elevato tasso di riproduzione su zucchini è stata utilizzata per costituire un allevamento di laboratorio. Come pianta ospite è stata utilizzata la varietà San Pasquale, un ecotipo di zucchini considerato una produzione tipica di pregio della Regione Campania. L'identità della specie *A. gossypii* è stata confermata con l'osservazione della morfologia e con l'uso del DNA barcoding, mediante sequenziamento di una regione del gene citocromo ossidasi subunità 1.

Allo scopo di identificare le proteine secrete nella frazione acquosa della saliva di *A. gossypii*, è stato utilizzato un approccio combinato di analisi trascrittomiche e proteomiche. La saliva è stata raccolta costringendo afidi adulti ad alimentarsi con una dieta liquida artificiale contenuta in sacchetti di parafilm. L'RNA estratto dalle ghiandole salivari, ottenute dalla dissezione di 500 afidi adulti, è stato utilizzato per ottenere il trascrittoma delle ghiandole. Le sequenze di cDNA ottenute sono state confrontate con i componenti proteici identificati nella saliva di *A. gossypii* mediante analisi proteomica. Quest'ultima condotta con elettroforesi SDS-PAGE e analisi LC/MS-MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry). Con questo

approccio è stato possibile identificare potenziali effettori, tra cui glucosio deidrogenasi, perossidasi, apolipoforine, aminopeptidasi N-like.

La risposta della pianta di zucchini all'infestazione di *A. gossypii* è stata studiata con l'esecuzione di biosaggi, consistenti in trattamenti alle piante di zucchini con infestazioni controllate di afidi oppure applicazioni fogliari di saliva, valutandone l'impatto sulla fitness degli afidi. I risultati ottenuti non hanno evidenziato alcuna influenza sui principali parametri biologici dell'afide (fertilità, durata dello sviluppo e longevità) non differenziandosi statisticamente tra piante trattate e piante controllo. E' emerso invece un significativo cambiamento del comportamento di fissaggio degli afidi nati sulle piante trattate. Sulle piante controllo le neanidi neo-deposte rimanevano prevalentemente sulla stessa foglia dove erano nate, mentre sulle piante trattate la maggior parte delle neanidi si allontanava dalla foglia precedentemente infestata o infiltrata con saliva, sulla quale erano nate, per disperdersi sull'intera pianta. Lo stesso comportamento di dispersione delle neanidi neonate è stato osservato su piante trattate con infestazione di afidi o applicazione di saliva sulla foglia basale e riproduzione della femmina adulta sulla foglia apicale non trattata, dalla quale le neanidi neonate si disperdevano verso gli altri organi della pianta. Ciò suggerendo una risposta della pianta di tipo sistemico. Una possibile spiegazione di questo comportamento di dispersione è l'attivazione della risposta della pianta attraverso il ciclo metabolico del salicilato, con produzione del composto volatile metil-salicilato, già noto indurre il comportamento di dispersione in altre specie di afidi. La risposta della pianta all'infestazione di *A. gossypii* è stata studiata con analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). I geni coinvolti nella sintesi del salicilato, quali isochorismate synthase 1 e 4-coumarate-CoA ligase 2, oltre a diversi geni responsivi al salicilato, sono risultati essere sovraespressi.

L'analisi complessiva dei dati ha reso possibile ipotizzare un ruolo del metil-salicilato come causa del comportamento di dispersione di *A. gossypii* su piante precedentemente infestate o infiltrate con saliva, evidenziando l'attività di componenti di quest'ultima come induttori di risposta di tipo sistemico.

## 2. ABSTRACT

### **Insect-plant interactions: *Aphis gossypii* Glover e *Cucurbita pepo* L.**

The detail of the interactions occurring between plants and herbivore insects is an interesting research field, and relatively new in respect to the interactions between plants and pathogens. Now it is generally accepted that insect feeding causes the endogenous production of elicitors of plant response, as well as the release of insect secretions, also involved in the induction of plant response. The present PhD thesis is a contribution to understanding the role of aphid saliva in the induction of the response of the courgette, *Cucurbita pepo* L., following the attack of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. This aphid species was field collected on several host plants, and the population with the best rate of increase on *C. pepo* cv San Pasquale was used to start the aphid rearing. The species identity was also confirmed by DNA barcoding by sequencing a region of the cytochrome oxidase subunit 1 gene.

In order to identify the proteins secreted in the watery fraction of aphid saliva, a transcriptomic/proteomic approach was adopted. Aphid saliva was collected allowing the aphids to feed into an artificial diet enclosed in parafilm sachets. The RNA of the salivary glands, obtained from the dissection of 500 *A. gossypii* adults, was used to obtain the gland transcriptome. The cDNA sequences were matched with the protein components identified in the aphid saliva, by using SDS-PAGE gel electrophoresis and LC/MS-MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) analysis.

The plant response to aphid infestation was measured by means of bioassays on courgette plants, where the treatment consisted of controlled infestations of *A. gossypii* or the application of saliva, collected as described above. Then, aphids were transferred to treated plants, and their fitness was measured. None of these treatments induced an impact on development time, longevity and fertility of aphids. Interestingly, the only change observed in *A. gossypii* was an alteration of the fixing behavior of the newborn nymphs, that showed a tendency to dispersal from the treated leaf to other plant organs, that was not observed in the control plants. Aphid dispersal behavior was also observed on basal leaf-treated plants when newborn nymphs originated by adult females reproducing on the untreated apical leaf, suggesting a systemic plant response. A possible explanation of this dispersal behavior is the activation of the plant response involving the salicylate (SA) pathway, resulting in the production of the volatile compound methyl-salicylate, well-known for promoting aphid dispersal. The plant response to the aphid infestation was studied by RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). The genes isochorismate synthase 1 e 4-coumarate-CoA ligase 2 involved in biosynthesis of SA were overexpressed, as well as SA responsive genes, suggesting the role of SA in the aphid behavior observed.

### **3.INTRODUZIONE**

#### **3.1 LE INTERAZIONI TRA GLI INSETTI E LE PIANTE**

Gli insetti seguono i più svariati regimi alimentari, ma quello più comune è la fitofagia. Infatti, circa la metà delle specie di insetti descritte si nutre a carico delle piante. All'attacco da parte dei fitofagi, la pianta oppone una serie di meccanismi di resistenza. Le categorie tradizionali della resistenza sono l'antixenosi, l'antibiosi e la tolleranza (Tremblay, 2003). L'antixenosi previene la colonizzazione da parte degli organismi estranei, ed è basata su barriere fisiche e chimiche (spine, tomentosità, suberificazione, cere, lattice, tannini, composti deterrenti). L'antibiosi si basa sulla presenza di composti che interferiscono con lo sviluppo degli insetti interferendo con l'alimentazione e la digestione o con la metamorfosi, oppure perché tossici (per esempio, alcaloidi, glicosidi cianogenici, glucosinolati). Le barriere antixenotiche ed antibiotiche possono essere presenti costitutivamente nei tessuti della pianta, ma la loro produzione può essere aumentata in seguito a danno meccanico (wounding) o all'attacco di fitofagi. Green e Ryan (1972) hanno osservato l'aumento di inibitori di proteasi nelle foglie di pomodoro in seguito a danno meccanico, operato con una lima, ed all'attacco di insetti con apparato boccale masticatore. Il progredire delle conoscenze ha dimostrato che l'attacco degli insetti masticatori ha in comune con il wounding la liberazione di acido linolenico dalle membrane cellulari danneggiate, con l'innescò di un percorso metabolico detto degli ottadecanoidi, o dell'acido giasmonico (JA), che porta alla produzione aumentata di composti ad attività difensiva (Walling, 2000). Un accumulo di inibitori di proteasi (IP) nei pressi del sito della ferita si osserva piuttosto rapidamente, con il risultato che l'insetto che se ne alimenta subisce il duplice danno di poter utilizzare scarsamente il cibo che ingerisce, mentre è indotta la produzione di enzimi, con



consumo di risorse, soprattutto aminoacidi solforati. Altri importanti antinutritivi indotti da wounding e da alimentazione di insetti sono enzimi ossidativi quali le polifenolossidasi (Fidantsef et al, 1999), che svolgono la loro attività difensiva nell'intestino, ma anche nei tricomi ghiandolari. Questo tipo di difesa è definito inducibile, perché viene indotto solo in seguito all'attacco, per evitare gli elevati costi metabolici di un set di difese sempre attivo, quali quelle costitutive (Heil, 2008).

### **3.2 LE INTERAZIONI TRA GLI AFIDI E LA PIANTA**

Gli afidi attaccano la pianta inserendo gli stiletti, guidati dall'estremità del labbro inferiore, nel tessuto della pianta, fino a raggiungere il floema, dove scorre la linfa elaborata. Questo tipo di alimentazione, al contrario di quello che succede con gli insetti masticatori, produce un danno meccanico molto scarso, mentre adotta una strategia che impedisce alla pianta di percepire l'attacco e quindi di innescare una risposta di difesa. Questa modalità di attacco è molto diversa da quella descritta per gli insetti masticatori, con l'attivazione del percorso JA. In realtà, dal punto di vista della risposta della pianta, gli afidi sono stati definiti come una forma intermedia tra gli insetti masticatori e gli organismi patogeni (Kaloshian & Walling, 2005), risultando in un'attivazione del ciclo metabolico del salicilato (SA), ma anche di quello del JA. In pomodoro è stato dimostrato che entrambi sono attivati dall'attacco di *Myzus persicae* (Sulzer) (Omottero: Aphididae), con prevalenza di geni del percorso SA sovraespressi, ed un'attivazione più limitata di geni correlati con JA (Coppola et al, 2013). Anche in relazione al rilascio di composti volatili, la pianta può emettere i prodotti di entrambi i percorsi metabolici; infatti al termine del percorso SA, un composto chiave è il suo derivato metile salicilato (MeSA), mentre diversi terpeni sono prodotti del percorso JA (Guerrieri & Digilio, 2008).

Gli afidi producono due tipi di saliva (Miles, 1999); la saliva più densa gelifica intorno agli stiletti, e isolando i tessuti della pianta dall'afide, impedisce la reazione della pianta nel sito di difesa (Felton & Eichenseer, 1999) e facilita il raggiungimento del sito di alimentazione (Rao *et al.*, 2013). Successivamente, una volta che l'estremità degli stiletti ha raggiunto, per tentativi, il tessuto floematico, inizia la produzione della saliva acquosa, ricca di enzimi litici e digestivi, quali lipasi, perossidasi, fenolossidasi, amilasi, cellulasi, proteasi, pectinasi (Will *et al.*, 2007). La modalità di alimentazione degli afidi è stata studiata grazie ad una tecnica che consente di ottenere un elettropenetrogramma (EPG, electrical penetration graph) in grado di studiare nel dettaglio le fasi di inserimento dello stiletto, salivazione, ingestione (Tjallingi 1988; 2006). La tecnica EPG ha consentito di osservare che, in seguito alla puntura delle cellule del floema, la pianta non chiude la ferita provocata dall'afide, perché la saliva contiene proteine che interagiscono con gli ioni  $Ca^{++}$  della cellula danneggiata (Will *et al.*, 2007). Questo si spiega con la presenza di proteine che agiscono come effettori nella saliva acquosa (Bos *et al.*, 2010), e le specie di afidi finora studiate hanno mostrato una notevole diversità nelle composizione delle proteine salivari (Will *et al.*, 2009). Alcuni autori all'approccio proteomico per lo studio delle proteine salivari stanno accoppiando un approccio di tipo trascrittomico (Bos *et al.*, 2010; Carolan *et al.*, 2011), che ormai ha costi affrontabili e consente la precisa identificazione delle proteine secrete.

### **3.3 APHIS GOSSYPHII GLOVER**

*Aphis gossypii* Glover (Emittero Omottero appartenente alla superfamiglia Aphidoidea, famiglia Aphididae) è noto come afide delle Malvacee e delle Cucurbitacee, afide del cotone o afide del melone. È una specie cosmopolita, ampiamente diffusa nelle regioni tropicali, subtropicali e temperate del mondo. *A. gossypii* è polifago,

con preferenza per malvacee (cotone, malva, ibisco), cucurbitacee (zucca, cetrioli, zucchine e anguria) e agrumi (Tremblay, 1981). *A. gossypii* generalmente è anolociclico; nel Sud Italia sverna come femmina adulta (Figura 3.1) (Pollini, 1998). In alcuni paesi (Nord Europa, Giappone, USA) è segnalata la presenza di olociclo dioico (Najar-Rodriguez *et al.*, 2009), con svernamento su *Rhamnus*, *Hibiscus*, *Catalpa* (Tremblay, 1981). Nell'areale campano Lo zucchini rappresenta una delle colture che maggiormente risente dell'attacco di *A. gossypii*. Le colonie dell'afide (Figure 3.2) invadono soprattutto la pagina inferiore delle piante, ma, in caso di forti infestazioni, possono essere attaccati anche i fiori. L'attacco dell'afide causa ingiallimento, accartocciamento dei lembi fogliari, avvizzimento e disseccamento delle foglie. Le piante colpite manifestano un generale sviluppo stentato. L'afide, inoltre, produce abbondante melata, favorendo l'instaurarsi delle fumaggini che aggravano ulteriormente il danno. *A. gossypii*, infine, risulta dannoso per la trasmissione di virosi. Nell'area mediterranea non sono segnalate virosi persistenti trasmesse dagli afidi a carico dello zucchini (Lecoq & Desbiez 2012; <http://www.cabi.org/>); i virus più comuni sono cucumber mosaic virus (CMV) (Carmo Sousa *et al.*, 2014), watermelon mosaic virus (WMV) e zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) (Salvaudon *et al.*, 2013).

L'identificazione su base morfologica di *A. gossypii* pone seri problemi a causa delle piccole dimensioni e dell'elevato polimorfismo intraspecifico. E' noto, però, che popolazioni prelevate da un ospite si sviluppano stentatamente su specie diversa (Najar-Rodriguez *et al.*, 2009). In Europa sono state descritte circa 20 specie del gruppo *gossypii-frangulae* e il DNA barcoding, basato sul sequenziamento di una regione del gene *citocromo ossidasi sub unità 1* (COI), è usato con successo per la discriminazione di *A. gossypii* dalle altre specie morfologicamente simili (Carletto *et al.*, 2009).



**Figura 3.1** *Aphis gossypii*, femmina virginopara, forma attera e alata



**Figura 3.2:** *Colonia di Aphis gossypii su Cucurbita pepo*

### **3.4 LO ZUCCHINO VARIETÀ SAN PASQUALE**

Il lavoro presentato in questa tesi è stato inizialmente inserito in un progetto di ricerca, finalizzato alla valorizzazione di produzioni ortive campane di eccellenza con strumenti di genomica avanzata (GenHort). Tra queste c'è lo zucchini (*Cucurbita pepo*) San Pasquale. Appartiene alla famiglia delle Cucurbitacee, è una pianta erbacea, annuale, con fusto tendenzialmente eretto e monocaule. Le foglie

sono palmate, di colore verde scuro e tomentose. La pianta è dicline e produce frutti di forma cilindrica oblunga, di colore verde con striature chiare, di 20-30 cm di lunghezza alla raccolta, dalle pregiate caratteristiche organolettiche. L'epoca di coltivazione varia dalla primavera all'autunno; in questo periodo è possibile eseguire più cicli di coltivazione e può essere coltivato sia in pieno campo sia in tunnel o serra. Il nome San Pasquale è legato all'epoca di trapianto tradizionale, il 17 maggio, giorno in cui si celebra San Pasquale Baylon (Regione Campania: prodotti tradizionali, 2016). Lo zucchini San Pasquale è particolarmente sensibile all'attacco di *A. gossypii* ed alle virosi da esso trasmesse

### **3.5 SCOPO DELLA TESI**

Obiettivo della ricerca è stato lo studio delle interazioni tra *A. gossypii* e la pianta di zucchini San pasquale. La saliva dell'afide è fonte di elicitatori in grado di indurre una risposta nella pianta, che può, a sua volta, avere un impatto su infestazioni successive. L'approccio seguito si è basato sull'esecuzione di biosaggi, consistenti in trattamenti delle piante di zucchini con infestazioni controllate di afidi oppure con applicazioni fogliari di saliva, in modo da valutare l'impatto sulla fitness degli afidi e sull'espressione genica della pianta. Inoltre, allo scopo di definire le principali componenti attive della saliva di *A. gossypii*, è stata eseguita un'analisi trascrittomico delle ghiandole salivari ed un'analisi proteomica della frazione liquida della saliva, raccolta in dieta artificiale.

## 4. MATERIALI E METODI

### 4.1 DETERMINAZIONE DELLA SPECIE *APHIS GOSSYPYII* GLOVER

Nella famiglia Aphidiidae sono presenti diverse specie morfologicamente simili ad *A. gossypii* (Lagos-Kutz *et al.*, 2014) e la loro discriminazione basata sulla tradizionale morfologia può essere problematica, a causa della scarsità o mancanza di caratteri morfologici discriminanti e della complessa associazione con diverse piante ospiti (Footitt *et al.*, 2008; Miller & Footitt, 2009; Lee *et al.*, 2011). Spesso, specie strettamente correlate dal punto di vista filogenetico, con simile o identica morfologia (specie criptiche), sono state identificate sulla base della loro associazione con le piante ospiti (Coeur d'acier *et al.*, 2014), ma tale criterio risulta difficilmente applicabile per le specie molto polifaghe, come è il caso di *A. gossypii*. Questa specie presenta una forte variabilità cromatica, potendo presentarsi nella forma bruna, anche tendente al verde-bluastro, o nella forma giallo-ocra, mentre i sifoni sono scuri, anche nelle forme chiare.

Nel presente studio, la specie è stata determinata utilizzando chiavi dicotomiche (Rongai & Cerato, 2001). Tra le principali caratteristiche morfologiche utilizzate: sifoni cilindrici di lunghezza media (almeno 2,5 volte la larghezza), diritti, pigmentati e non reticolati, colorazione tibie posteriori, assenza di placche cerosi sull'addome. Le forme alate hanno la nervatura mediana biforcata due volte. Questa metodica tradizionale ha consentito la determinazione degli afidi in allevamento come *Aphis frangulae gossypii* Glover, 1877.

L'identità tassonomica della specie in allevamento è stata ulteriormente definita utilizzando la tecnica del DNA barcoding, che si basa sul sequenziamento di una regione di circa 700 bp del gene COI (citocromo ossidasi subunità 1) (Hebert *et al.*, 2004; Hajibabaei *et al.*,

2007). Il DNA barcoding si è dimostrato un'alternativa efficace all'identificazione morfologica delle specie criptiche di afidi (Footitt *et al.*, 2008, Rebijith *et al.*, 2013, Coeur d'acier *et al.*, 2014) ed è stato utilizzato con successo per discriminare *A. gossypii* dalle altre specie del gruppo *frangulae* (Carletto *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Il DNA è stato estratto secondo il metodo di Rose *et al.* (1994), con alcune modifiche. Dieci afidi adulti sono stati singolarmente macerati con un pestello sterile in un tubo per microcentrifuga da 1,5 ml contenente 25 µl di buffer TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8). Il campione macerato è stato incubato a 95°C per 5 minuti, raffreddato per altri 5 minuti in ghiaccio e, quindi, centrifugato per 5 minuti alla velocità di 14.000 rpm. Il surnatante (2 µl) è stato utilizzato per l'amplificazione di un frammento di circa 700 bp del gene COI utilizzando 23 µl di buffer composto da 12,5 µl di Dream Taq Master Mix (Thermo Scientific), 10 µl di H<sub>2</sub>O nucleasi-free e 0,25 µl di forward e reverse primer (50 pmol/µl), rispettivamente. E' stata utilizzata la coppia di primer LCO1490 (5'-CAAGGTCAAATCATAAAGATATTGG -3 ') e HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994). Per l'amplificazione sono stati utilizzati i seguenti parametri: denaturazione iniziale per 5 min a 94 °C, seguita da 34 cicli di 1 minuto a 94 °C, 1 min a 45 °C, e 1 min a 72 °C e una successiva estensione finale a 72 °C per 5 min. I prodotti di PCR sono stati evidenziati mediante elettroforesi su gel all'1,2% di agarosio in TAE (Tris-acetato-EDTA) buffer 1x e colorazione con SYBR Green. Il frammento di DNA è stato eluito utilizzando il Montage Gel Extraction Kit (Millipore, USA) e 0,5–1 µg del prodotto di amplificazione è stato legato al vettore pGEM-T Easy (Promega, USA), secondo le istruzioni del produttore, e clonato in cellule competenti di *Escherichia coli* strain DH5α. Il DNA del plasmide ricombinante è stato preparato come descritto da Hattori and Sakaki (1986) e l'inserto è stato sequenziato presso la MWG Biotech (Ebersber,

Germania). Nel complesso, tre individui sono stati sottoposti a sequenziamento in unica direzione.

#### **4.2 ALLEVAMENTO DI PIANTE E AFIDI**

L'elevata e diffusa variabilità intraspecifica di *A. gossypii* ha reso necessari campionamenti da diverse piante ospiti naturali (ibisco, melanzana, melone, zucchino) dell'afide, seguiti da allevamenti pilota, e tra questi è stata selezionata la popolazione che, allevata su zucchino San Pasquale in camera climatica, ha mostrato il tasso di accrescimento più elevato. La popolazione di *A. gossypii* in allevamento, sulla quale è stata svolta la sperimentazione, è stata costituita partendo da individui raccolti nel 2013 in una coltura di anguria nel comune di Terracina (LT). Le piante sono state trasferite in laboratorio, dove, gli afidi sono stati singolarmente trasferiti dalle foglie di anguria, con l'aiuto di un pennello, su piante di zucchino cultivar San Pasquale. Sulle foglie erano presenti anche afidi parassitizzati (mummie) da *Aphidius* spp. (Hymenoptera: Braconidae). Solo gli afidi apparentemente non parassitizzati, cioè non mummificati, sono stati trasferiti. L'impossibilità a riconoscere nel materiale di campo gli afidi contenenti uova, embrioni e larve dei parassitoidi ha reso necessario, per diverse generazioni, un continuo monitoraggio dello stato di contaminazione dell'allevamento con eliminazione delle "mummie" prima che potesse avvenire lo sfarfallamento dei parassitoidi adulti.

Nell'area mediterranea non sono segnalate virosi persistenti trasmesse dagli afidi a carico dello zucchino (Lecoq & Desbiez 2012; <http://www.cabi.org/>); i virus non persistenti più comuni trasmessi da *A. gossypii* sono cucumber mosaic virus (CMV) (Carmo Sousa *et al.*, 2013), watermelon mosaic virus (WMV) e zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) (Salvaudon *et al.*, 2013). Nel caso della trasmissione non persistente, le particelle virali imbrattano gli stiletto boccali, ma non si diffondono al tubo digerente ed alle ghiandole salivari, pertanto il



contatto con il vettore non risulta stabile e duraturo (Tremblay, 1996). L'infettività viene acquisita rapidamente, ed altrettanto rapidamente viene persa; le neanidi neopartorite, purché sia evitato il contatto con materiale vegetale infetto, non sono infettive. Sono state isolate 50 femmine adulte virginopare attere dalla progenie degli afidi raccolti in campo su anguria. Ciascuna femmina è stata posta in una piastra Petri del diametro di 9 cm all'interno della quale veniva posizionato un disco di carta assorbente inumidita dello stesso diametro, in assenza di parti vegetali. Le neanidi neonate sono state trasferite su piantine di zucchino allo stadio fenologico di emissione della seconda foglia vera. Questa procedura ha consentito di ottenere una popolazione risanata da virus non persistenti, in quanto ottenuta da individui che non si sono alimentati sulle piante che ospitavano gli afidi potenzialmente infetti, ma su piante ottenute in laboratorio e mai a contatto con insetti.

L'allevamento così ottenuto di *A. gossypii* è stato mantenuto in gabbie, costruite per l'occasione, costituite da un telaio di legno e chiuse da rete anti-afidi (50 mesh), con un lato apribile mediante cerniere. Gli isolatori misuravano 80 x 100 x 20 cm ed ospitavano ciascuno 7-8 piante di zucchino allo stadio fenologico di seconda foglia vera, in vasi del diametro di 10 cm (Figura 4.1). L'allevamento è stato ospitato in una camera climatica, e le condizioni ambientali sono state: temperatura di 22-23°C, umidità relativa 70% e fotoperiodo 16L: 8D. All'interno della camera climatica sono state posizionate trappole cromotropiche gialle per la cattura di eventuali insetti provenienti dall'esterno ed eventuali alate di *A. gossypii* sfuggite durante le operazioni di manutenzione dell'allevamento.

L'allevamento ha prodotto il materiale necessario per dissezioni, biosaggi ed infestazioni controllate. Gli afidi utilizzati per le diverse prove sperimentali sono stati sincronizzati, consentendo la riproduzione di femmine virginopare adulte su piante non infestate per alcune ore; la rimozione della femmina adulta permetteva di

ottenere una coorte di neanidi coetanee, da utilizzare nello stadio più opportuno a seconda della prova da svolgere.



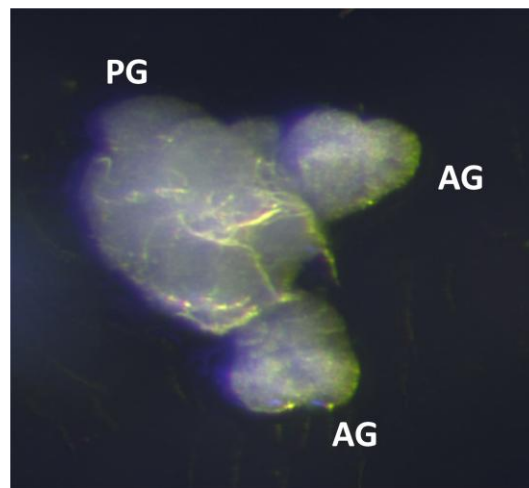
**Figura 4.1:** *Gabbia di allevamento con piante di zuccchino San Pasquale infestate da A. gossypii*

#### **4.3 RACCOLTA DELLE GHIANDOLE SALIVARI**

La femmina adulta attera di *A. gossypii* misura 1,6-2 mm di lunghezza. Per isolare e raccogliere le ghiandole salivari, gli afidi sono stati dissezionati al microscopio stereoscopico con ingrandimento 120x (Leica M165 C), utilizzando spilli entomologici (0,15 mm di diametro) lavati in alcool. La dissezione è stata eseguita in 20 µl di tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4) sterile, su un vetrino da microscopia. Le ghiandole (Figura 4.2), dopo 3-5 lavaggi in PBS per rimuovere eventuali residui di altri tessuti, sono state trasferite in una soluzione di TRIzol® Reagent (Life Technologies) e conservate a -80 °C in gruppi di 10. E' stata effettuata un'estrazione preliminare di RNA dalle ghiandole salivari per stimare la quantità di ghiandole necessarie per poter estrarre RNA sufficiente per la successiva analisi trascrittomico. L' estrazione dell'RNA è stata eseguita in TRIzol® con il kit PureLink™ RNAMicro (Life Technologies) secondo le istruzioni del

produttore. Allo scopo cento ghiandole sono state raccolte in 200 µl di TRIzol in una provetta Eppendorf da 1,5 ml. Il campione è stato omogeneizzato attraverso ripetuti cicli di congelamento e scongelamento e con l'aiuto di pipetta e vortex. Quindi, dopo un incubazione di 5 min per la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine, sono stati aggiunti 50 µl di cloroformio, l'omogenato è stato agitato a mano per 50 volte, incubato per 3 min e centrifugato a 10 000 x g per 10 min a 4°C. E' stata ottenuta una fase superiore, acquosa, contenente RNA, ed una fase inferiore, rossa, contenente DNA e proteine.

La fase superiore è stata trasferita in una nuova provetta, miscelata con 125 µl di alcool isopropilico, incubata per 10 min e centrifugata (12 000 x g, 15 min, 4°C). Dopo avere rimosso il sovrantante, il pellet di RNA è stato lavato con 0,5 ml di etanolo al 75% (acqua DEPC), centrifugato (12 000 x g, 5 min, 4°C), il nuovo sovrantante è stato rimosso ed il pellet asciugato all'aria per 10 min e sciolto in 10 µl di acqua DEPC RNase-free. Quantità e qualità dell'RNA ottenuto sono state valutate con lettore Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e visualizzate su gel di agarosio all'1%, insieme a 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Questa lettura ha mostrato che dalle ghiandole di 100 afidi è possibile ottenere 290 ng di RNA totale. Sono state quindi raccolte 500 ghiandole, in modo da ottenere una quantità di circa 1500 ng di RNA, e conservate a -80°C in TRIzol, fino a che sono state inviate al laboratorio Genomix4Life srl presso l'Università degli Studi di Salerno per l'analisi RNA-Seq.



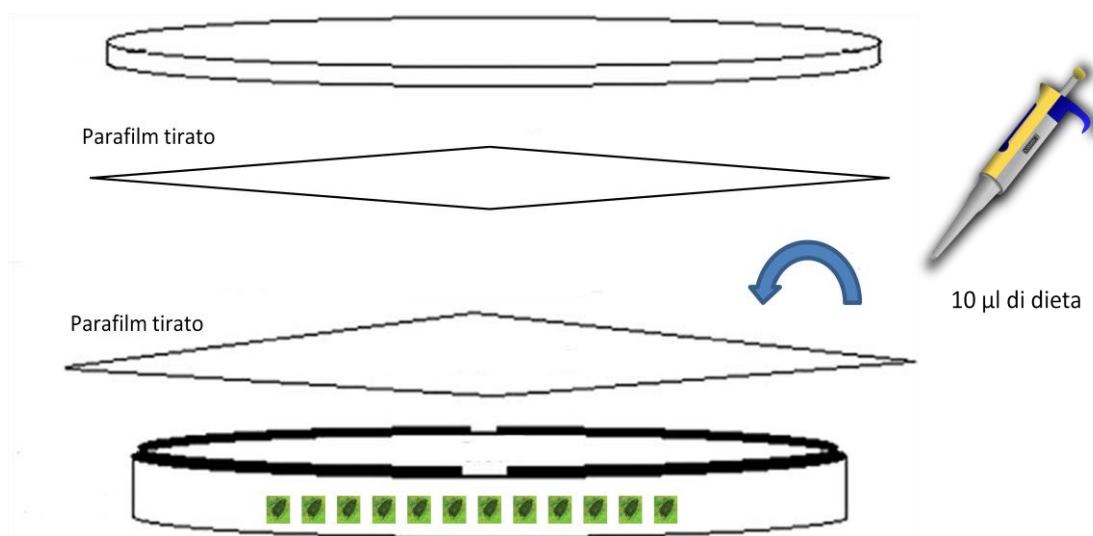
**Figura 4.2:** Ghiandola salivare di *Aphis gossypii*. PG: ghiandola principale; AG: ghiandola accessoria.

#### 4.4 RACCOLTA DELLA SALIVA

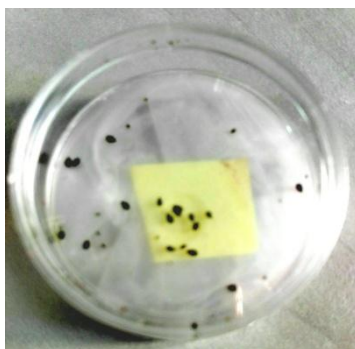
La saliva è stata raccolta come descritto da Cooper *et al.* (2010), mediante l'utilizzo di dieta artificiale racchiusa in sacchetti di parafilm.

La dieta artificiale utilizzata è una soluzione acquosa di saccarosio al 10%, che consente la raccolta di saliva in maniera più efficace rispetto a diete anche più complesse, come quelle contenenti aminoacidi (Cooper *et al.*, 2010). Il parafilm è stato ritagliato e stirato manualmente per assottigiarlo e quindi sterilizzato ai raggi UV per 20 minuti. Un volume di 10 µl di dieta artificiale è stato racchiuso tra due strati di parafilm, formando un sacchetto contenente dieta artificiale abbastanza sottile da poter essere perforato dagli stilette degli afidi. Sono state così allestite le unità di raccolta della saliva, costituite da una piastra Petri del diametro di 3,3 cm chiusa da un sacchetto con dieta, all'interno della quale sono stati trasferiti 20 afidi con l'aiuto di un pennellino (Figura 4.3). Gli afidi, precedentemente sincronizzati, erano *A. gossypii* adulti in fase pre-riproduttiva. Gli afidi sono stati osservati per controllare il fissaggio e l'inizio dell'alimentazione, quindi, le piastre sono state incubate per 24 ore alla temperatura di 22-23°C, umidità relativa 70%

e fotoperiodo 16L:8D (Figura 4.4). Dopo 24 ore, i due strati di parafilm sono stati delicatamente separati e la dieta contenente la frazione solubile della saliva è stata raccolta mediante una micropipetta a volume variabile (1-10 $\mu$ l). Il contenuto di 50 piastre Petri, corrispondente alla saliva prodotta da 1000 afidi, è stato conservato a -80°C in singole provette Eppendorf da 1,5 ml.



**Figura 4.3:** Rappresentazione schematica della piastra Petri contenente gli afidi e la dieta artificiale.



**Figura 4.4:** Unità di raccolta della saliva di *Aphis gossypii*.

La saliva solubile ottenuta mediante raccolta nei sacchetti di Parafilm montati su capsule Petri, come descritto sopra, è stata sottoposta ad elettroforesi SDS-PAGE, in modo da avere un'indicazione di quantità e peso molecolare della componente proteica della saliva. Un volume di 6,5 µl di dieta e saliva è stato incubato con 2,5 µl di tampone (NuPAGE Sample buffer) e 1 µl di agente riducente (NuPAGE) per 10 min a 70 °C, e caricato nei pozzetti di un gel di poliacrilamide, utilizzando il kit NuPAGE Bis-Tris Precast Gel al 4-12% (ThermoFisher), condizioni della corsa 200V e 125 mA. E' stato caricato anche il marcatore SeeBlue (183-3 KDa). Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato immerso in una soluzione fissativa per un'ora (operazione ripetuta due volte) e, successivamente, in soluzione di lavaggio (per 20 minuti in agitazione). Quindi è stato lavato per 3 volte (acqua MilliQ) ed infine colorato al nitrato d'argento (45 min). E' stato analizzato il profilo proteico di pool di diverse raccolte, contenenti la saliva prodotta da 70, 90 e 150 afidi, disciolta in 20, 30 e 50 µl di dieta rispettivamente.

Preliminarmente alla raccolta della quantità di saliva da destinare all'analisi proteomica, sono state saggiate combinazioni con quantità diverse di afidi e dieta, per selezionare le più produttive in termini di proteine. Sono stati allestiti sacchetti di parafilm contenenti 5, 10 e 20 µl di dieta, su cui sono stati posti ad alimentarsi per 24 ore un numero di afidi variabile da 5 a 30. Il contenuto in proteine della dieta con saliva è stato analizzato mediante il kit Qubit (Invitrogen).

La raccolta massale di saliva da destinare all'analisi proteomica, sulla base dei risultati preliminari, è fatta utilizzando un'unità di raccolta costituita da 10 µl di dieta artificiale e 20 afidi adulti.

## **4.5 ANALISI TRASCRITTOMICA DELLE GHIANDOLE SALIVARI E PROTEOMICA DELLA SALIVA**

L'approccio seguito in questa tesi ha reso necessaria una doppia analisi: le ghiandole salivari di *A. gossypii* sono state sottoposte ad analisi trascrittomica, ed il loro secreto, in particolare la frazione acquosa della saliva raccolta in dieta artificiale, è stata sottoposta ad analisi proteomica. I risultati delle due analisi sono stati quindi messi a confronto.

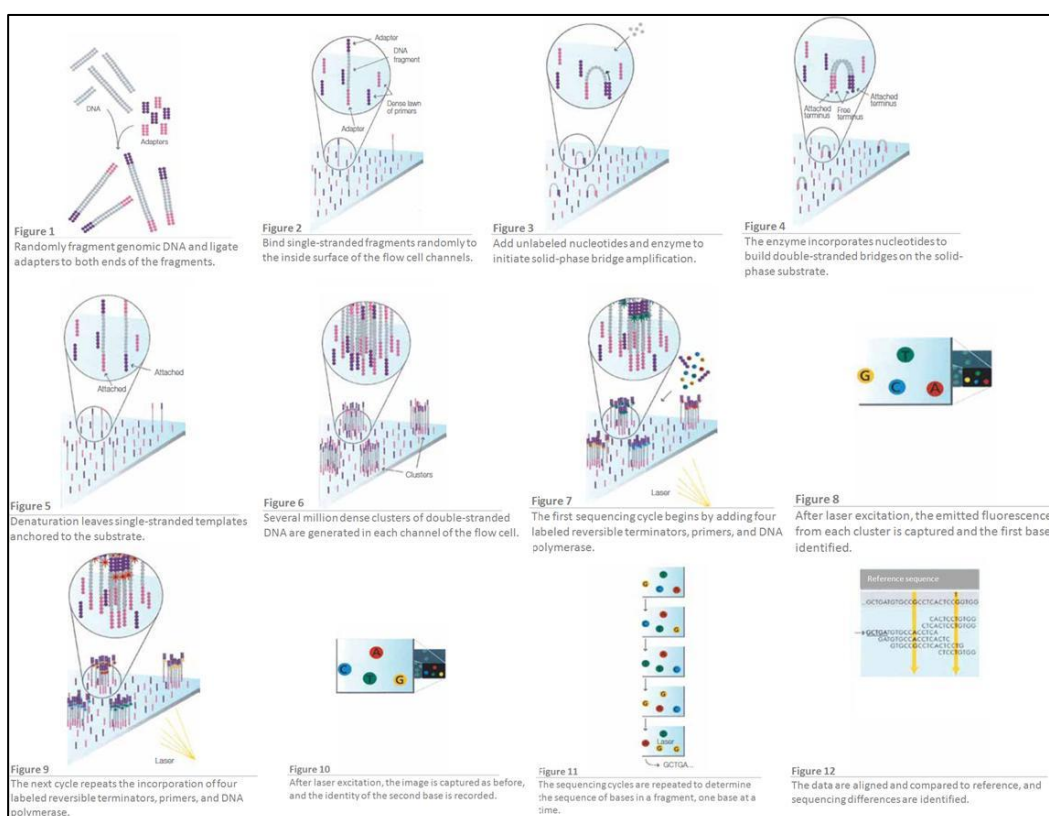
### **4.5.1 RNA-SEQ DELLE GHIANDOLE SALIVARI**

La metodica del sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) è ormai comunemente utilizzata per studiare i trascrittomi. Le moderne metodiche di "Next-Generation Sequencing" (Xiong *et al.*, 2010; Schuster, 2008) hanno sostituito il metodo di sequenziamento di Sanger, molto preciso ma più lento e costoso. Queste tecniche, definite "high-throughput sequencing", o sequenziamento ad alta resa, consentono l'analisi di un'elevatissima quantità di sequenze, anche in parallelo, producendo milioni di "short reads" in una singola corsa. La relativa economicità della procedura e la sua velocità stanno rivoluzionando l'approccio analitico dei genomi e allo stato attuale, il suo limite maggiore risulta proprio l'enorme quantità di dati ottenibile, che richiede una successiva analisi bioinformatica.

L'RNA-Seq delle ghiandole salivari è stato commissionato al laboratorio Genomix4Life. In breve, il sequenziamento è consistito delle seguenti fasi:

1. estrazione dell'RNA delle ghiandole salivari
2. creazione di una "library" di RNA
3. trascrizione inversa e produzione di cDNA
4. frammentazione del cDNA
5. Sequenziamento dei frammenti (reads) ottenuti

Ogni molecola così ottenuta è stata sequenziata (sequenziamento ad alta resa) mediante la piattaforma IlluminaTruSeq Stranded mRNA, che ha consentito di ottenere sequenze paired-end della lunghezza di 2x100 bp. Alla fine della corsa di sequenziamento (4 giorni circa), i frammenti sono stati filtrati per eliminare quelli di bassa qualità (tra 32 e 40 bp) (Avolio, 2015). Il procedimento è illustrato in Figura 4.5.



**Figure 4.5:** La tecnica di sequenziamento mediante la piattaforma Illumina (<http://www.illumina.com/>)

La piattaforma Illumina HiSeq1500 ha prodotto circa 40 000 000 reads / campione di mRNA. L'analisi bioinformatica dei dati ottenuti è stato svolta presso Sequentia Biotech.



#### **4.5.2 ANALISI PROTEOMICA DELLE PROTEINE SALIVARI**

La frazione solubile della saliva degli afidi è stata raccolta, come descritto sopra, in una soluzione acquosa di saccarosio al 10%. I campioni di dieta, in totale 3 ml, contenenti la saliva prodotta da circa 15200 afidi, sono stati inviati ad un servizio esterno, il laboratorio di proteomica del CEINGE-Biotecnologie Avanzate con sede a Napoli, dove è stata eseguita l'analisi proteomica. La dieta contenente la saliva raccolta è stata radunata in un unico pool, e la concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio di Bradford, risultando in un contenuto di proteine di 12 µg/ml, una quantità sufficiente per procedere con l'analisi proteomica. Quindi il campione è stato concentrato e sottoposto a precipitazione con metanolo-cloroformio per rimuovere il saccarosio della dieta artificiale. Il campione di saliva è stato sottoposto ad elettroforesi delle proteine SDS-PAGE su gel al 10%, colorato al Coomassie colloidale, allo scopo di frazionare le bande proteiche in base al peso molecolare. L'intero campione è stato risospeso in 20 µl di loading buffer, DTT 100 mM, e caricato in un unico pozzetto; nella corsa elettroforetica è stato utilizzato il marker All Blue (BIORAD). Al termine della corsa sono state identificate 17 bande, che sono state ritagliate dal gel, lavate in ammonio bicarbonato / acetonitrile fino a completa decolorazione, e singolarmente trattate per ottenere una miscela di peptidi / proteine.

Le bande più abbondanti sono state sottoposte ad identificazione mediante spettrometria di massa tandem (LC/MS-MS) dal Professor Pucci e collaboratori, nel laboratorio di proteomica del CEINGE. La miscela di peptidi/proteine è stata analizzata in una trappola LC/MSD Trap XCT Ultra (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipaggiata con un 1100 HPLC system e chip cube (Agilent Technologies). Il campione è stato frazionato in una colonna capillare a fase inversa a C18, e monitorato sullo spettrometro di massa. Infine, le sequenze ricavate dagli spettri di massa ottenuti dall'analisi

LC/MS-MS sono state annotate da un punto di vista funzionale interrogando con il software Blastp il database di proteine NCBI nr.

#### **4.6 INTERAZIONI TRA LO ZUCCHINO SAN PASQUALE E *APHIS GOSSYPII***

Gli esperimenti di seguito descritti hanno lo scopo di evidenziare la risposta della pianta all'attacco di *A. gossypii* ed il conseguente impatto su fitness e comportamento degli afidi. In questo set di esperimenti è stata valutata la risposta degli afidi a precedenti infestazioni controllate e ad applicazione di saliva. Tutti i biosaggi sono stati svolti su piante alla stadio di seconda foglia vera distesa. Le condizioni sperimentali delle camere climatiche, per tutti i biosaggi, sono state: temperatura 22-23°C, umidità relativa 70% e fotoperiodo 16L: 8D. Le piante utilizzate per i biosaggi sono state poste singolarmente in isolatori 30x30x30 chiusi con cerniera (Figura 4.6)



**Figura 4.6:** *Pianta di zucchini San Pasquale posta singolarmente in un isolatore.*

#### **4.6.1 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI *A.***

##### ***GOSSYPII* – INFESTAZIONE CONTROLLATA**

###### **4.6.1.1 Fertilità**

La fertilità degli afidi è stata valutata come numero di neanidi prodotte a partire dall'inizio della riproduzione e per 10 giorni. La foglia basale (prima foglia vera) di ciascuna pianta è stata infestata con 50 afidi allo stadio di neanide di terza età (N3), rimossi dopo 48 ore. Immediatamente dopo, un singolo afide adulto in fase pre-riproduttiva è stato posto sulla foglia precedentemente infestata. Tutti gli afidi hanno iniziato la riproduzione entro le 24 ore successive, e per 10 giorni è stata quotidianamente contata la progenie prodotta dal singolo afide adulto su ogni pianta saggiata. La prova è stata svolta in 10 repliche. Analogamente si è proceduto su 10 piante controllo coetanee, che non avevano ricevuto il trattamento di infestazione.

###### **4.6.1.2 Fertilità e comportamento di dispersione delle progenie.**

Nel corso del biosaggio descritto in 4.6.1.1 è emerso che, al termine dei 10 giorni, la progenie prodotta dalla singola femmina sulla foglia precedentemente infestata tendeva ad allontanarsi da quest'ultima, spostandosi su altre parti della pianta (stelo, cotiledoni, altre foglie sovrastanti la prima). Sulle piante controllo, invece, la progenie tendeva a rimanere sulla foglia dove la madre era stata posizionata. E' stato allestito un biosaggio, analogo al precedente, per quantificare con precisione la risposta comportamentale della progenie dell'adulto saggiato. Quindi, oltre a contare le neanidi prodotte per 10 giorni dall'inizio della riproduzione, ne è stato definito il comportamento di dispersione. In particolare, è stato conteggiato il numero di neanidi che rimaneva sulla foglia dove erano state partorite e quello delle neanidi che si disperdevano su altre parti della pianta (cotiledoni, seconda foglia, germoglio apicale).

#### **4.6.1.3 Durata dello sviluppo, fertilità e comportamento di dispersione della progenie**

Sono stati trasferiti 50 afidi allo stadio di N3 sulla prima foglia, e lasciati ad alimentarsi per 48 ore. Quindi gli afidi sono stati rimossi, ed un singolo afide allo stadio di neanide di prima età (N1) è stato posto sulla foglia precedentemente infestata. Sono state utilizzate neanidi coetanee, nate tutte alla distanza massima di due ore l'una dall'altra. Sono state eseguite 10 repliche. Analogamente si è proceduto su 10 piante controllo non infestate. Nei successivi giorni è stato seguito lo sviluppo della N1 fino all'inizio della fase riproduttiva. Quindi, come nei precedenti esperimenti, è stata contata la progenie prodotta fino a 10 giorni dall'inizio della riproduzione e ne è stato valutato il comportamento di dispersione, come descritto per l'esperimento precedente.

#### **4.6.2 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI *A. GOSSYPHII* – TRATTAMENTO CON SALIVA**

Gli esperimenti di seguito descritti hanno avuto come obiettivo la valutazione dell'attività sulla pianta della saliva di *A. gossypii*, in assenza dell'afide. La quantificazione di tale risposta è avvenuta attraverso la misurazione di caratteri biologici e comportamentali degli afidi, come nei biosaggi precedenti, allevati su piante che avevano ricevuto il trattamento con saliva.

L'infiltrazione di saliva è consistita nella deposizione sulla pagina superiore della foglia basale di 150 µl di dieta artificiale, raccolta come descritto nel paragrafo 4.4.

Era stato precedentemente osservato che il trattamento foliare con la dieta al 10% di saccarosio induceva sintomi di fitotossicità (ingiallimento e quindi disseccamento della zona di foglia trattata), quindi sono state preliminarmente saggiate concentrazioni di

saccarosio inferiori, estendendo l'osservazione della comparsa dei sintomi a 15 giorni, più lunga del biosaggio progettato. Per questo, è stata applicata dieta al 3 ed al 5% di saccarosio e, su 10 piante per ciascuna concentrazione, non si sono evidenziati sintomi. Quindi la saliva, raccolta come descritto in 4.4 in dieta al 10%, fagostimolante, è stata diluita per il trattamento delle foglie, ottenendo una concentrazione finale del saccarosio del 5%, in modo da utilizzare, tra i trattamenti non fitotossici, quello meno diluito. Pertanto, dopo la diluizione, 150 µl di dieta contenevano la saliva di circa 150 afidi. In questo set di biosaggi, abbiamo utilizzato come controllo piante trattate con la sola dieta (senza saliva) e piante che non avevano ricevuto alcun trattamento.

#### **4.6.2.1 Durata dello sviluppo, fertilità e comportamento di dispersione della progenie**

La foglia basale è stata trattata con 150 µl di dieta al 5% di saccarosio, contenente la saliva di 150 afidi. Dopo 48 h dall'infiltrazione, un singolo afide allo stadio di N1 è stato posizionato sulla foglia trattata. Le neanidi erano sincronizzate, come descritto in 4.6.5.1, e nate alla distanza massima di due ore l'una dall'altra. Nei giorni seguenti è stato seguito lo sviluppo dell'afide fino allo stadio adulto e l'inizio della fase riproduttiva. Quindi sono state contate le neanidi prodotte nei 10 giorni successivi all'inizio della riproduzione e ne è stato definito il comportamento di dispersione contando le neanidi che permanevano sulla prima foglia, dove era stata posizionata la madre e le neanidi che migravano su altre parti della pianta.

L'infiltrazione di saliva è stata eseguita su 10 piante di zucchini. Analogamente si è proceduto su 10 piante controllo, trattate con dieta al 5% di saccarosio.

#### **4.6.2.2 Fertilità e comportamento di dispersione della progenie**

La foglia basale è stata trattata con 150 µl di dieta al 5% di saccarosio, contenente la saliva di 150 afidi. Dopo 48 h dall'infiltrazione, un singolo afide adulto in fase pre-riproduttiva è stato posizionato sulla foglia trattata. Il controllo era costituito dalla sola dieta (150 µl al 5% di saccarosio). Il trattamento con saliva è stato messo a confronto con il trattamento di infestazione controllata: la foglia basale è stata infestata con 50 N3, che dopo 48 ore sono state rimosse; un singolo afide adulto in fase pre-riproduttiva è stato posizionato sulla foglia precedentemente infestata. Un controllo è stato costituito da piante che non avevano ricevuto alcun trattamento.

Ognuna delle 4 tesi è stata replicata su 10 piante. Quindi, per ciascun afide, sono state contate le neanidi prodotte in 10 giorni dall'inizio della riproduzione. Il comportamento di dispersione è stato definito contando le neanidi che permanevano sulla foglia precedentemente trattata (dieta + saliva, dieta, infestazione, nessun trattamento) e le neanidi che migravano su altre parti della pianta.

#### **4.6.3 FERTILITÀ E COMPORTAMENTO DI DISPERSIONE DELLA PROGENIE - RISPOSTA SISTEMICA.**

La risposta sistemica è stata valutata sia su piante infiltrate con saliva che su piante infestate. La procedura sperimentale adottata è stata analoga a quella del biosaggio descritto in 4.6.2.2, con l'allestimento di quattro tesi: foglia basale trattata con 150 µl di dieta al 5% + saliva (tesi 1); trattata con 150 µl di sola dieta (tesi 2); infestata con 50 afidi allo stadio di N3 (tesi 3); nessun trattamento (tesi 4). Per ciascuna tesi sono state saggiate 10 piante. La differenza rispetto all'esperimento 4.6.2.2 risiede nel diverso posizionamento sulla pianta dell'afide da saggiare. Trascorse 48 ore dal trattamento, che, per la tesi 3, coincide con la rimozione dei 50 afidi, un singolo afide in fase pre-riproduttiva è stato posto sulla foglia apicale (non più sulla

foglia trattata basale, come nei precedenti esperimenti). Quindi, è stata contata la progenie prodotta da ciascun afide in 10 giorni dall'inizio della riproduzione, e ne è stato definito il comportamento di dispersione contando le neanidi che permanevano sulla foglia dove erano state deposte e quelle che migravano su altre parti della pianta.

#### **4.6.4. ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica dei dati relativi alla fertilità è stata eseguita con il test ANOVA ad una via con il software STATGRAPHICS Plus (Manugistics Inc., Rockville, MD, 1995).

I confronti relativi alla frequenza di distribuzione della progenie tra la foglia di deposizione e le altre parti della pianta sono stati condotti mediante analisi delle tabelle di contingenza utilizzando il Test G di Indipendenza (McDonald, 2014).

#### **4.6.5 ANALISI DELLA RISPOSTA DELLO ZUCCHINO ALL'ATTACCO DEGLI AFIDI**

##### **4.6.5.1 Infestazione controllata di *A. gossypii***

Le piante di zuccchino utilizzate per l'infestazione controllata sono state ottenute ponendo i semi singolarmente in vasi da 10 cm di diametro, ed allevate per 4 settimane in ambiente climatizzato, alla temperatura di 22 – 23 °C, UR 70±5%, fotoperiodo con ciclo luce-buio di 16:8 ore.

Gli afidi sono stati sincronizzati mediante la seguente procedura: afidi adulti in fase riproduttiva sono stati scelti dall'allevamento e trasferiti su piante non infestate. Dopo 2 ore, gli adulti sono stati rimossi, e le neanidi prodotte, tutte coetanee, sono state allevate per 7 giorni alle stesse condizioni descritte sopra.

Le piante di zuccchino sono state utilizzate allo stadio fenologico di seconda foglia vera distesa. Le piante sono state infestate ognuna con 10 afidi sincronizzati come descritto sopra, suddivisi sulle 2 foglie

(5 afidi per foglia). Dopo 24 ore, gli afidi sono stati contati, e dopo avere constatato che i 5 afidi posti inizialmente erano ancora presenti sulla foglia, sono stati delicatamente rimossi con un pennellino. La porzione di foglia su cui si trovavano gli afidi è risultata sempre contenuta in un rettangolo dai lati di circa 2-4 cm, a seconda della distanza a cui si erano posizionati gli afidi, che è stato ritagliato con forbici lavate in etanolo al 70% ed immediatamente trasferito in azoto liquido. La stessa operazione è stata ripetuta al tempo di 48 e 96 ore. Per ogni punto temporale sono state allestite 5 repliche biologiche. Un totale di 15 piante sono state utilizzate. Le 15 piante di controllo erano state allevate negli stessi ambienti ed alle stesse condizioni, ma non erano state infestate.

#### **4.6.5.2 Analisi di espressione RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)**

Questa tecnica prevede l'isolamento del RNA e la sintesi del primo filamento di DNA complementare (cDNA) all'RNA messaggero e la successiva amplificazione di sequenze specifiche tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR).

#### **4.6.5.3 Estrazione RNA da foglia**

Il protocollo di estrazione dell'RNA prevede le seguenti fasi:

- Macerazione di circa 0,5 g di tessuto in azoto liquido con mortaio e pestello
- Trasferimento in 2 tubi da 2 ml contenenti 750 µl di buffer di estrazione RNA autoclavato (100 mM Tris-Cl pH 8,5, 100 mM cloruro di sodio, 20 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS) e 750 µl di fenolo/cloroformio 1:1 (v/v), agitazione con il vortex immediatamente fino a che non si forma un'emulsione
- Centrifugazione a 14000 rpm a 4°C per 5 min



- Prelievo della fase acquosa e ripetizione dell'estrazione con fenolo/cloroformio
- Prelievo della fase acquosa e ripetizione dell'estrazione con solo cloroformio
- Conservazione per qualche minuto in ghiaccio per allontanare eventuali residui di cloroformio
- Prelievo della fase acquosa e aggiunta di 750 µl di isopropanolo, trasferimento in ghiaccio per 5 min e centrifugazione a 14000 rpm a 4°C per 10 min
- Eliminazione del sovrnatante
- Asciugare bene il pellet e risospensione in 400 µl di acqua DEPC 1 ‰ (dietilpirocarbonato) sterile
- Aggiunta di 400 µl 4M cloruro di litio ed incubazione per una notte in ghiaccio
- Centrifugazione per 20 min a temperatura ambiente a 14000 rpm, prelievo del sovrnatante e risospensione del pellet in 400 µl di acqua DEPC
- Centrifugazione per 5 min a 10000 rpm per rimuovere eventuale materiale insolubile e trasferire il sovrnatante in una nuova eppendorf
- Aggiunta di 40 µl di 3M acetato di sodio (pH 7.0) e di 1 ml di etanolo 96%, incubazione per 10 min a -80°C e centrifugazione per 10 min a 14000 rpm a 4°C
- Asciugare bene il pellet
- Risospensione del pellet in 42 µl di acqua distillata sterile

#### **4.6.5.4 Quantificazione dell'RNA**

L'RNA è stato quantificato mediante analisi allo spettrofotometro Biophotometer (Eppendorf) attraverso la seguente procedura:

- Misurazione dell'assorbanza a 260 nm con lo spettrofotometro del RNA diluito 100 volte in TE (pH 8,5)

- Calcolo della concentrazione in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  del RNA secondo la formula (1)

$$[1] 1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$$

La qualità dell'RNA estratto è stata valutata attraverso elettroforesi su gel di agarosio 1,2% preparato in buffer TAE con aggiunta di 2  $\mu\text{L}$  di GelRed (Biotium). 5  $\mu\text{g}$  di ogni campione sono stati trattati a 65°C per 5 minuti in seguito all'aggiunta di 20  $\mu\text{l}$  di 10X Loading buffer RNA [400  $\mu\text{l}$  Formammide, 120  $\mu\text{l}$  formaldeide 37%, 5  $\mu\text{l}$  loading buffer 10X (50% glicerolo, 0.25 blu di bromofenolo, 0.25 xilene cianolo)]. Dopo l'incubazione i campioni sono stati caricati su gel ed è stata applicata una differenza di potenziale di 5 V/cm per 60 minuti. La valutazione dell'integrità delle bande dell'RNA ribosomiale è stata poi effettuata visualizzando gli acidi nucleici con un transilluminatore UV.

#### **4.6.5.5 Trattamento con DNAsi**

Contaminazioni di DNA sono state eliminate attraverso il trattamento dei campioni con DNAsi secondo la seguente procedura:

- Risospensione di 10  $\mu\text{g}$  di RNA in 20  $\mu\text{l}$  di acqua DEPC
- Aggiunta di 3  $\mu\text{l}$  10X DNase I Buffer (NEB), 3  $\mu\text{l}$  2U/ $\mu\text{l}$  DNase I (NEB)
- Portare la miscela di reazione ad un volume finale di 30  $\mu\text{l}$  e incubare a 37°C per 30 min
- Aggiunta di 3  $\mu\text{l}$  di 3M acetato di sodio (pH 7,0) e di 90  $\mu\text{l}$  di etanolo 96% e incubazione per 10 min a -80°C
- Centrifugazione per 10 min a 14000 rpm 4°C.
- Risospensione del pellet in 22  $\mu\text{l}$  di H<sub>2</sub>O e quantificazione allo spettrofotometro

#### 4.6.5.6 Sintesi del cDNA

L'RNA messaggero è stato retrotrascritto utilizzando il kit Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) che prevede le seguenti fasi:

- Aggiunta, a 2 µg di RNA DNA FREE 1 µl di oligo (dT)<sub>18</sub> primer (0.5 µg/ µl) e portare ad un volume finale di 12 µl con acqua sterile.
- Incubazione della miscela a 70°C per 5 min
- Posizionamento dei tubi in ghiaccio- Aggiunta di 4 µl di 5X Reaction buffer, 1 µl di RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 µg/µl) e 2 µl di 10mM dNTP mix
- Agitazione e raccolta del campione alla base dell'eppendorf mediante breve centrifugazione
- Incubazione a 37°C per 5 min
- Aggiunta di 1 µl di Revertaid™ M-MuLV Transcriptase (200 U/µl) e incubazione a 42°C per 60 min
- Interruzione della reazione tramite incubazione a 70°C per 10 min e conservazione del cDNA ottenuto a -20°C

#### 4.6.5.7 Controllo della sintesi del cDNA

L'avvenuta sintesi del cDNA è stata accertata attraverso l'amplificazione di una porzione del gene *Ef1-α*, costitutivo in pianta, utilizzando i primer Ef\_Cpepo Fw e Ef\_Cpepo Rv (Tabella 1). 1 µl di cDNA è stato utilizzato come template ed è stata allestita la reazione PCR secondo la procedura descritta di seguito. Al cDNA sono stati aggiunti 10 µl GoTaq Buffer 5X (Promega), 0,4 µl di dNTP 25mM, 2,5 µl di entrambi i primer 10 mM e 0,3 µl di GoTaq 5 U/µl (Promega). La miscela di reazione è stata portata ad un volume finale di 50 µl con acqua distillata ed incubata nel termociclatore Applied Biosystem gene amp 2700. Il ciclo base di amplificazione è stato preceduto da una fase iniziale di denaturazione (95°C per 5 minuti) e seguito da una fase di polimerizzazione finale (72°C per 7 minuti) con una fase di annealing di 30 secondi ad una temperatura dipendente dalla sequenza dei primer. Una aliquota di 10 µl dei prodotti di

amplificazione sono stati preparati con 2 µl di Loading Dye 6X e sono poi stati caricati su gel di agarosio 1,2%. La corsa elettroforetica è stata effettuata applicando una differenza di potenziale di 5 V/cm per 45 minuti e la visualizzazione delle bande è stata ottenuta attraverso esposizione ai raggi UV.

#### **4.6.5.8 Real Time RT-PCR**

L'analisi di espressione genica, fra due o più genotipi, è stata effettuata mediante Real Time RT-PCR utilizzando una concentrazione di 0,3 µM di ciascun primer. La reazione PCR è stata allestita utilizzando 4 µl di cDNA, diluito 10 volte, come template ed aggiungendo 12,5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Kit (Applied Biosystems) e 0,75 µl di entrambi i primer 10 mM. Portando la reazione ad un volume finale di 25 µl con acqua distillata è stata incubata nel termociclatore 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) secondo il seguente schema:

- Denaturazione a 94°C per 30 secondi
- Fase di appaiamento alla Ta dei primer (Tabella 1) per 15 secondi. Il ciclo di amplificazione prevede due step preliminari di 50°C per 2 min e di 95°C per 10 min e la macchina è stata settata per registrare i dati di fluorescenza nella fase di appaiamento dei primer. Ogni amplificazione è stata ripetuta tre volte e i valori di fluorescenza sono stati poi analizzati dal software 7000 System SDS Software (Applied Biosystems) per calcolare i valori dell'RQ (*Relative Quantification*) con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak e Schmittgen, 2001). I valori dell'RQ sono stati ottenuti utilizzando il gene endogeno EF-1α come riferimento, di cui è stata amplificata una regione utilizzando i primer Ef\_Cpepo Fw e Ef\_Cpepo Rv riportati in tabella 4.1.

**Tabella 4.1.** *Primer e loro caratteristiche impiegati per le analisi di espressione.*

Primer Name	Primer Sequence	Tm °C	Product size
4LC1 Fw	5'- ACTTCTCCCTCACGGTGTCT -3'	60	130
4CL1 Rv	3'- GTGCCGCCGATTCTTTTAGC -5'	60	
ICS1 Fw	5'- AACGCTTCATCCAACCTCCCG -3'	60	119
ICS1 Rv	3'- CTCCAAACCAACCAACAGGC -5'	59	
PR5 1b Fw	5'- CTGCGTCTCCCATAGCCAAA -3'	60	111
PR5 1b Rv	3'- GTTCAGGATCGGAGTTGGGG -5'	60	
PR5 Fw	5'- GAGACCTGGCGCACTCAAAA -3'	60	150
PR5 Rv	3'- CCTCTCTCTAACCCCGCTCT -5'	60	
PR-2.12a Fw	5'- AGGACAAAACCCAACGGAGG -3'	60	130
PR-2.12a Rv	3'- CATCAGACCTCGCCATACCC -5'	60	
PR-2.12b Fw	5'- AATGGCGGAATGGAGGTTGT -3'	60	89
PR-2.12b Rv	3'- TCGACCCGCATAATACGACG -5'	60	
PR-2.7 Fw	5'- GGCGACTTGACCGTAGTTGA -3'	60	112
PR-2.7 Rv	3'- GGCTTCCACTCTTCTTCGCT -5'	60	
NUDX8 Fw	5'- GCTGAGCCGGGTACTTGAT -3'	60	102
NUDX8 Rv	3'- GATGACGAATCCTCCGACCC -5'	60	
SAG21 Fw	5'- AGATTACTGTTCTCGCCGC -3'	60	138
SAG21 Rv	3'- GGTCCTATCCGCTCTCGTTG -5'	60	
Ef_Cpepo Fw	5'- -3'ATTCGAGAAGGAAGCTGCTG-3'	60	129
Ef_Cpepo Rv	3'- -5'TTGGTGGTCTCAAACCTCCAC-3'	60	

## 5. RISULTATI

### 5.1 DETERMINAZIONE DELLA SPECIE *APHIS GOSSYPHII* GLOVER

Dal punto di vista morfologico la popolazione afidica in allevamento è stata classificata come *Aphis gossypii* (= *frangulae gossypii*). L'identità tassonomica è stata confermata dall'analisi del gene COI. Le tre sequenze ottenute, ciascuna di 707 bp, sono risultate identiche tra loro. Tramite Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponibile al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, la regione sequenziata del gene COI ha evidenziato la più elevata identità (99-100%) con le sequenze del gene COI di *A. gossypii*, mentre la percentuale di identità nucleotidica nei confronti della stessa regione del gene COI di *A. frangulae*, la specie morfologicamente più simile ad *A. gossypii*, è risultata del 98%. Nel complesso, sia l'analisi morfologica che molecolare hanno evidenziato che la popolazione oggetto di studio può essere attribuita alla specie *A. gossypii*.

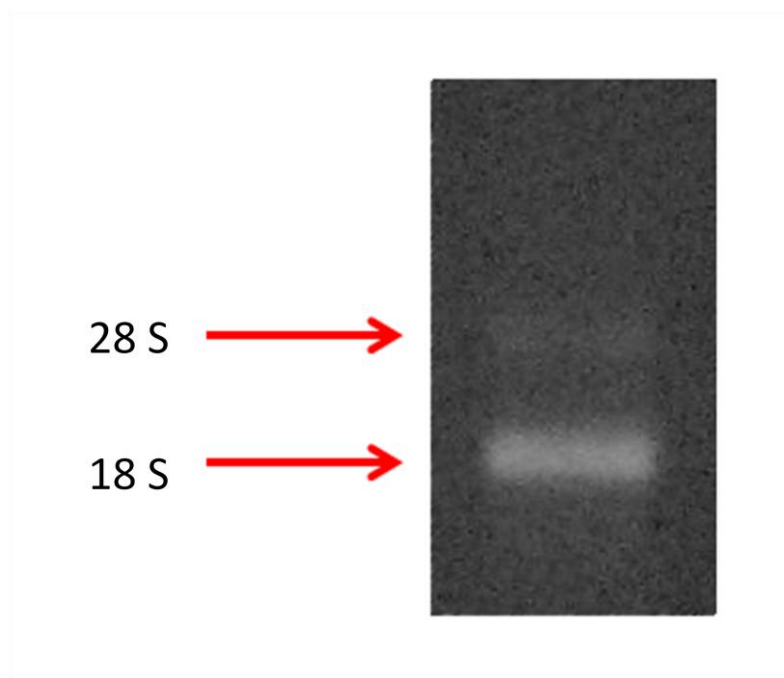
### 5.2 ANALISI TRASCRITTOMICA E PROTEOMICA DELLE GHIANDOLE SALIVARI E DELLA SALIVA

#### 5.2.1 RACCOLTA GHIANDOLE SALIVARI

La quantità di RNA estratto dalle ghiandole salivari di 100 afidi è risultata sufficiente per essere visualizzata su gel di agarosio, come mostrato dall'immagine elettroforetica in figura 5.1.

L'analisi spettrofotometrica al NanoDrop ha mostrato che dall'estrazione di RNA effettuata con TRIZOL dalle ghiandole salivari di 100 afidi sono stati ottenuti 290 ng di RNA. Tale RNA è risultato non contaminato da proteine ( $1.8 > A_{260}/A_{280} < 2.0$ ) o da carboidrati o fenoli ( $A_{260}/A_{230}$  intorno a 2.2). La sua integrità è stata inoltre verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Figura 5.1), che ha consentito di evidenziare le due bande 28S e 18S. Questo ha permesso la messa a punto del metodo di estrazione di RNA di

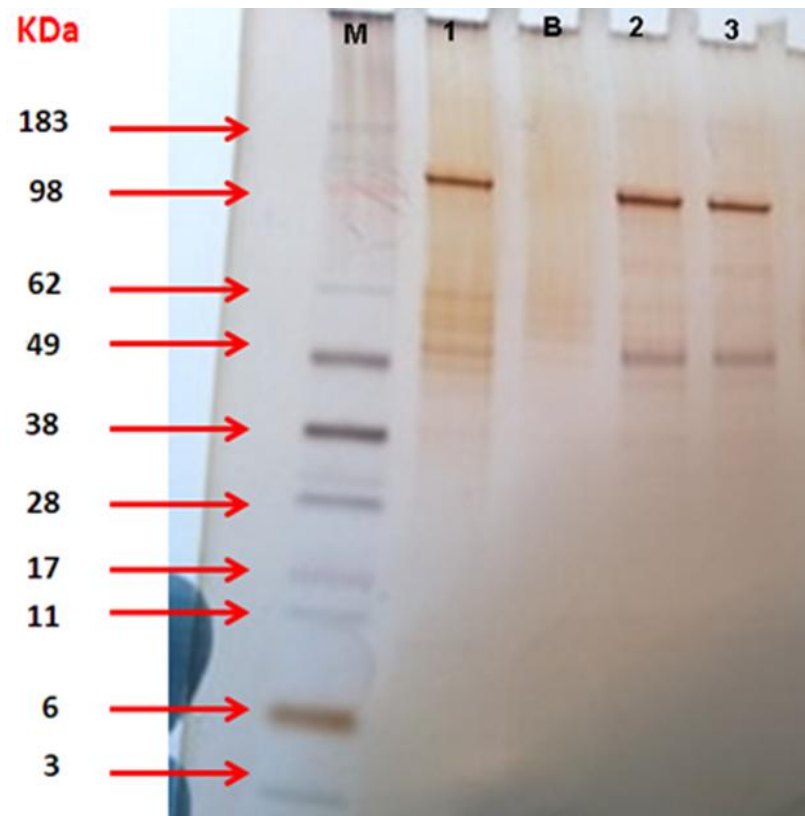
alta qualità per l'analisi successiva, e di valutare la quantità di ghiandole necessaria per il sequenziamento dell'RNA (Genomix4Life), stimata in 500 ghiandole.



**Figura 5.1:** *Valutazione della qualità dell'RNA estratto. Elettroforesi su gel di agarosio dell'RNA ricavato dalle ghiandole salivari di 100 afidi*

### **5.2.2 RACCOLTA DELLA SALIVA DI *APHIS GOSSYPII***

Le raccolte di saliva preliminari, sottoposte ad elettroforesi delle proteine, hanno mostrato una banda molto abbondante del peso molecolare di circa 130-140 KDa, leggermente più spessa nei campioni con minore numero di afidi (Figura 5.2). Una seconda banda, di circa 50 KDa, diventava visibile solo all'aumentare del numero di afidi costitutivi del pool di dieta + saliva caricato nel pozzetto.



**Figura.5.2:** Gel SDS-PAGE della saliva di *Aphis gossypii*. Legenda. M: marcatore di peso molecolare; B: Bianco (solo dieta); (1) saliva prodotta da un pool di 70 afidi; (2) di 90 afidi e (3) di 150 afidi.

La determinazione del contenuto di proteine salivari nella dieta ha mostrato che la combinazione tra volume di dieta e numero di afidi più produttiva si ottiene quando 20 afidi si alimentano su 10  $\mu$ l di dieta. Un numero di afidi più elevato non consente di ottenere una quantità maggiore di proteine salivari, probabilmente per l'azione di disturbo dovuta all'affollamento (Tabella 5.1).



**Tabella 5.1:** *Proteine ottenute (ng) utilizzando diverse combinazioni tra quantità di dieta e numero di afidi. Il trattino indica una quantità troppo bassa per essere rilevabile.*

μl dieta \ N afidi	5	10	20	30
	ng di proteine totali			
5	-	190	195	-
10	-	190	382	-
20	-	-	195	-

### 5.2.3 GHIANDOLE SALIVARI: ASSEMBLAGGIO DEL cDNA E TRASCRITTOMA

I dati relativi all'assemblaggio sono stati forniti da Sequentia Biotech, e le principali statistiche sono qui elencate. La tecnologia Illumina è stata utilizzata per generare milioni di corte sequenze (read) rappresentative dell'intero trascrittoma delle ghiandole salivari. Dalle estremità di ogni frammento di DNA sono state ottenute 2 read indipendenti da 100 bp, in totale circa 40 000 000 reads. L'assemblaggio de novo è stato ottenuto con il software Trinity (Grabherr *et al.*, 2011), che consente di assemblare un trascrittoma in mancanza di un genoma di riferimento. In seguito a controllo di qualità e pulizia dei dati, basati sulla selezione di reads con lunghezza minima pari a 35 pb e punteggio di qualità minimo di 25, sono stati assemblati 30660 contig, 1063,43 bp di lunghezza media. I valori di espressione (FPKM) dei trascritti assemblati sono stati calcolati con il tool Express (versione 1.5.1).

---

#### Statistiche dell'assemblaggio

---

<b>Trascritti</b>	30660
<b>Lunghezza totale</b>	32604775bp
<b>Lunghezza media</b>	1063.43bp
<b>Trascritto più lungo</b>	15464bp
<b>GC%</b>	35.06
<b>N50</b>	1801bp

---

I trascritti di alta qualità sono stati tradotti in proteine mediante il tool TransDecoder. Sulle sequenze dei trascritti assemblati sono state identificate le ORF (Open Reading Frames) per poter predire le sequenze aminoacidiche delle proteine derivate da queste. Sono state tradotte 18082 proteine, di lunghezza di almeno 50 aminoacidi. Di queste, 10308 (57%) erano complete, presentando una metionina ed un codone di stop, 1772 (9.80%) cominciavano con una metionina ma erano prive di codone di stop, 2735 (15.13%) avevano solo il codone di stop e 3267 (18.06%) non cominciavano con metionina né terminavano con un codone di stop.

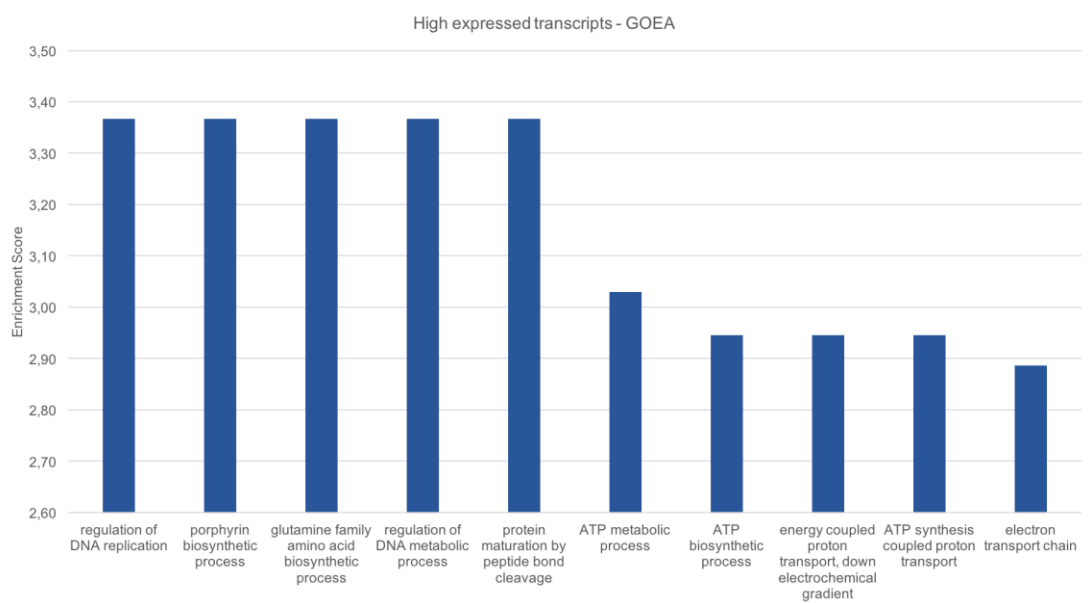
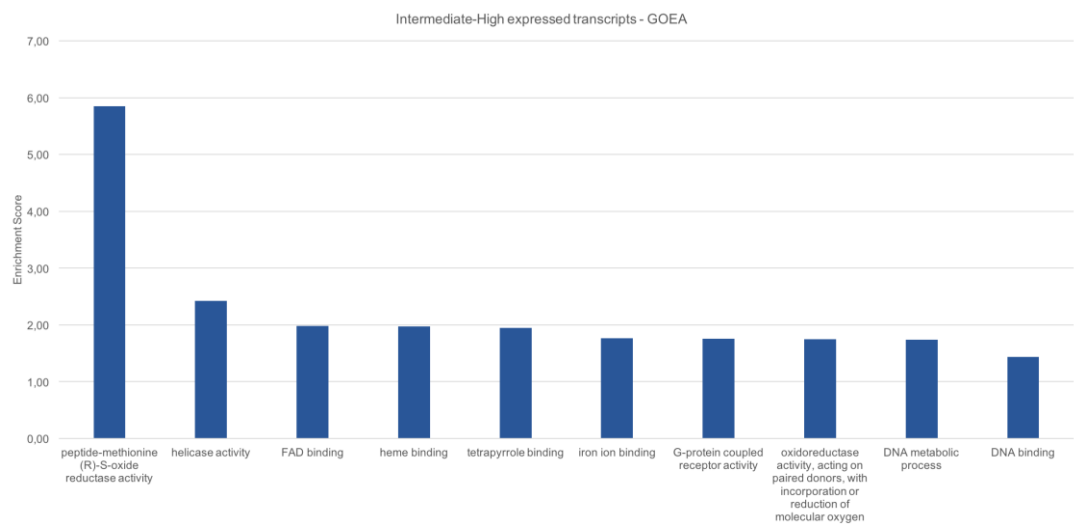
<b>Proteine</b>	<b>Numero</b>	<b>%</b>
<b>Proteine totali</b>	18082	
<b>Proteine complete</b>	10308	57
<b>Proteine senza MET iniziale</b>	2735	15,13
<b>Proteine senza codone di stop</b>	1772	9,80
<b>Proteine senza MET iniziale e senza codone di stop</b>	3267	18,06

Le sequenze codificanti ottenute da TransDecoder sono state annotate per la loro funzione attraverso il database InterPro ed il software InterProScan, che consente l'analisi funzionale delle proteine e la loro classificazione in famiglie, oltre alla produzione di Gene Ontology (GO) e di annotazione KEGG. Le sequenze delle proteine sono anche state usate per un'analisi BlastP nel database NCBI, per ottenere l'annotazione funzionale delle proteine in base alla similarità delle sequenze, recuperando i nomi dei geni delle proteine del database NCBI più simili (e-value  $\leq 0.01$ ).

Inoltre, è stata eseguita una Gene Ontology Enrichment Analysis (GOEA) per caratterizzare meglio i trascritti espressi nelle ghiandole salivari, grazie al tool on-line AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>). In base ai valori FPKM, i trascritti

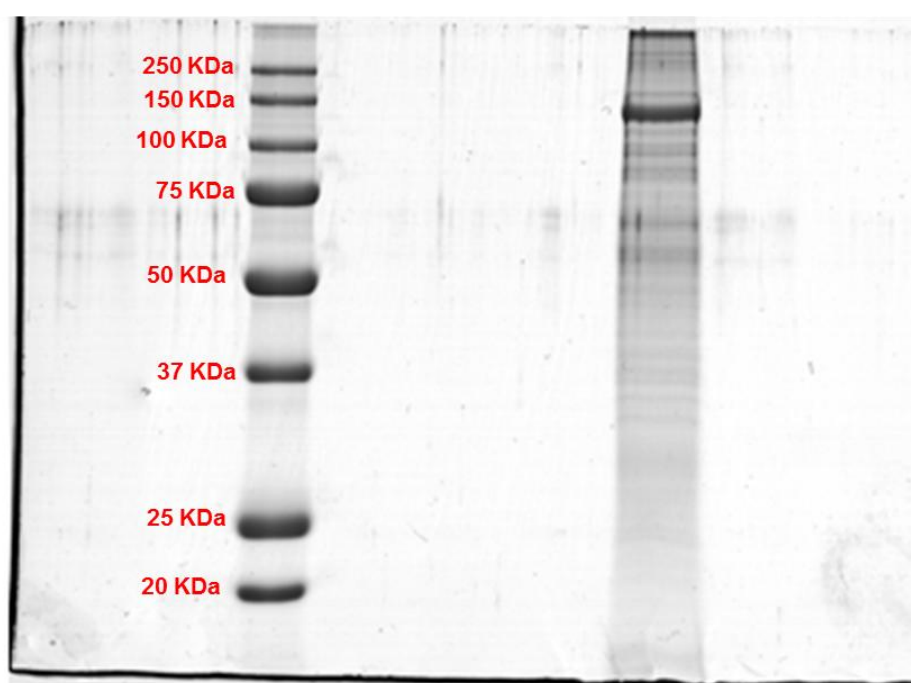
sono stati raggruppati in 4 gruppi: espressione bassa (FPKM <= 4.116), medio-bassa (FPKM > 4.116 and FPKM <= 8.425), medio-alta (FPKM > 8.425 and FPKM <= 19.330) e alta (FPKM > 19.330)





#### 5.2.4 IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE SALIVARI

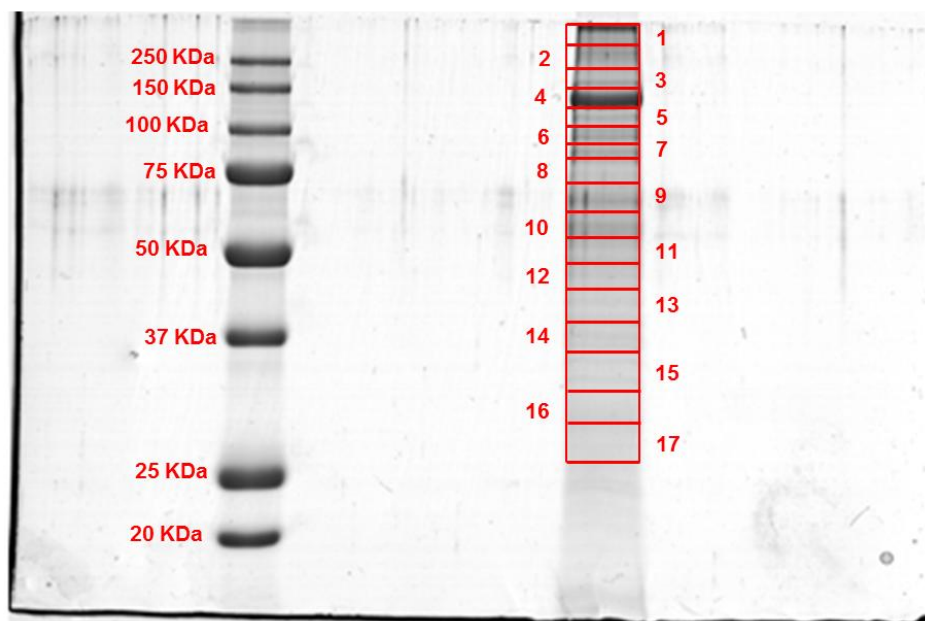
In totale è stata raccolta la saliva prodotta da 15200 afidi. I campioni raccolti nel tempo, riuniti in unico pool, hanno prodotto una concentrazione di proteine di circa 12 microgrammi/ml. L'elettroforesi delle proteine ha mostrato la presenza di bande soprattutto nella parte più alta del gel, ai pesi molecolari più elevati, ed in particolare una banda particolarmente abbondante del peso di circa 130-140 KDa, probabilmente costituita da diversi polipeptidi.



**Figura 5.3:** Gel SDS-PAGE della saliva di *Aphis gossypii*. A sinistra i marcatori di peso molecolare, a destra le bande ottenute da 10 µg di estratto liofilizzato di saliva.

Il gel è stato suddiviso in bande, come mostrato in figura 5.3, che sono state escisse per essere sottoposte alla procedura di identificazione mediante spettrometria di massa. La procedura descritta è stata svolta attraverso un servizio esterno (CEINGE). Sono stati selezionati per l'analisi proteomica i primi 8 raggruppamenti di bande, corrispondenti ai pesi molecolari più elevati, perché il gel ha

mostrato che in queste bande si trovano i polipeptidi più abbondanti (Figura 5.4).



**Figura 5.4:** Gel SDS-PAGE della saliva di *Aphis gossypii*. A sinistra i marcatori di peso molecolare, a destra le bande evidenziate in rosso in vista dell'analisi proteomica

E' risultato che una "banda" escissa può mascherare più polipeptidi parzialmente sovrapposti a causa delle masse molecolari vicine. Le sequenze aminoacidiche derivanti dall'analisi LC/MS-MS sono state appaiate attraverso il software Mascot 2.4 con il database dei contig originati dal trascrittoma delle ghiandole salivari. Sono stati considerati validi gli appaiamenti con almeno 2 peptidi. La tabella seguente (Tabella 5.2) riporta l'elenco delle proteine salivari di *A. gossypii* identificate, suddivise per bande. La seconda colonna elenca le annotazioni relative a sequenze tradotte di singoli contig ritrovati nel database SwissProt. Le sequenze aminoacidiche di ogni contig sono state utilizzate per una ricerca nel database NCBI nr, ed il numero di accessione risultante è riportato nella terza colonna della tabella, con l'organismo dove è stata identificata.

**Tabella 5.2.** Identificazione LC/MS-MS delle proteine della saliva di *Aphis gossypii*.

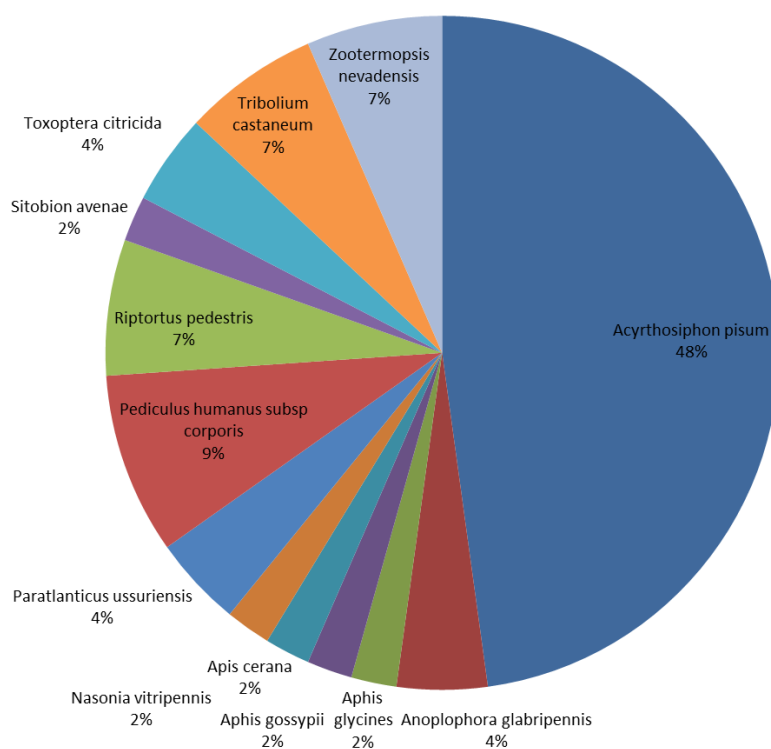
<b>Banda 1</b>	<b>SwissProt</b>	<b>NCBI nr</b>
DN13133_c0_g1_i1	Apolipophorins	E0VFC1 <i>Pediculus humanus subsp. corporis</i>
DN13223_c0_g2_i3	Fatty Acid Synthase-like Isof X3	D6W6D2 <i>Tribolium castaneum</i>
<b>Banda 2</b>		
DN9926_c0_g1_i3	Acetyl-CoA Carboxylase isoform X2	E0VSX2 <i>Pediculus humanus subsp. corporis</i>
DN11997_c0_g1_i1	Fatty Acid Synthase-like	X1WSJ2 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
<b>Banda 3</b>		
DN12562_c0_g1_i1	Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor HC H3 isof X1	J9JRA6 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
DN9293_c0_g1_i1	Glucose Dehydrogenase -like	J9JJF6 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
<b>Banda 4</b>		
DN10815_c0_g1_i1	Staphylococcal Nuclease domain-containing protein 1	J9KAE3 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
DN12871_c0_g2_i14	2-Oxoglutarate DH, isoform X1	V9IK01 <i>Apis cerana</i>
DN12701_c0_g1_i1	Ser/Thr-protein kinase clkA isoform X1	J9JK67 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
DN17198_c0_g1_i1	Heat Shock Protein 83-like	J7FXV7 <i>Paratlanticus ussuriensis</i>
DN11446_c0_g1_i1	Aminopeptidase N-like	D6WB37 <i>Tribolium castaneum</i>
DN11020_c0_g2_i1	Insulin-Degrading Enzyme isoform X2	V5GIB3 <i>Anoplophora glabripennis</i>
DN8829_c0_g1_i1	Translation Elongation Factor 2	Q5XUB4 <i>Toxoptera citricida</i>
<b>Banda 5</b>		
DN1135_c0_g1_i1	Pyruvate Carboxylase, isoform X1	J9JSI7 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
DN13223_c0_g2_i1	Fatty Acid Synthase-like isoform X1	0A0G3YJ66 <i>Aphis gossypii</i>
DN10664_c0_g1_i1	Ubiquitin-like Modifier-activat Enz 1	R4WDT6 <i>Riptortus pedestris</i>
DN6578_c0_g1_i1	Hypoxia up-regulated P 1 isoform X1	J9K7V8 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
DN1413_c0_g2_i1	Uncharacterized Prot C05D11.1-like	J9K9K1 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
DN11786_c0_g1_i1	Neutral Alpha-Glucosidase AB	E0VVD2 <i>Pediculus humanus subsp. corporis</i>
<b>Banda 6</b>		
DN4008_c0_g1_i1	Unch P LOC100159632 isoform X2	J9JLB7 <i>Acyrtosiphon pisum</i>
DN17198_c0_g1_i1	Heat Shock Protein 83-like	J7FXV7 <i>Paratlanticus ussuriensis</i>
DN12170_c0_g1_i4	Unch P LOC100169243	K0DCJ9

DN10611_c0_g1_i1	Puromycin-Sensitive Aminopeptidase	<i>Sitobion avenae</i> E0VR15
DN8440_c0_g1_i2	Glycogen Phosphorylase Isoform X1	<i>Pediculus humanus subsp corporis</i> K71QK0
DN8829_c0_g1_i1	Translation Elongation Factor 2	<i>Nasonia vitripennis</i> Q5XUB4
DN8458_c0_g1_i1	Transitional ER ATPase TER94	<i>Toxoptera citricida</i> V5GMY8
DN1913_c0_g1_i1	Aconitate Hydratase 1	<i>Anoplophora glabripennis</i> J9K5S7
DN12723_c1_g1_i2	ATP citrate lyase isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i> X1WV43
		<i>Acyrtosiphon pisum</i>
<b>Banda 7</b>		
DN12962_c0_g2_i1	Unch P DDB_G0277255	J9JU97
DN1588_c0_g1_i1	Moesin/Ezrin/Radixin hom 1 isof X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i> R4WQU4
DN11789_c0_g1_i1	Peroxidase-like	<i>Riptortus pedestris</i> J9JKW5
DN13206_c0_g1_i1	Unch Fam 31 glucosidase KIAA1161-like	<i>Acyrtosiphon pisum</i> J9K5D6
DN11412_c0_g1_i1	Euk Translation Init Factor 3 Sub B	<i>Acyrtosiphon pisum</i> J9JVT9
DN2705_c1_g1_i1	Delta-1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthase	<i>Acyrtosiphon pisum</i> D6WB12
		<i>Tribolium castaneum</i>
<b>Banda 8</b>		
DN11613_c0_g1_i2	Heat Shock Protein 70	K9LSD3
DN13206_c0_g1_i3	Unc. Family 31 Glucosidase KIAA1161-like	<i>Aphis glycines</i> J9K5D6
DN1588_c0_g1_i1	Moesin/Ezrin/Radixin homolog 1 isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i> J9KAN2
DN6909_c0_g1_i1	Threonine--tRNA ligase	<i>Acyrtosiphon pisum</i> A0A067QUE9
DN10861_c0_g1_i1	Trifunctional Enzyme sub alpha	J9K1G1
DN9945_c0_g1_i1	Pyruvate DH Protein X component	J9K5G0
DN2891_c0_g2_i1	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase 75 kDa subunit	A0A067RL60
DN10027_c0_g1_i1	Phenoloxidase Subunit A3-like	<i>Zootermopsis nevadensis</i> R4WPL8
		<i>Riptortus pedestris</i>
DN9236_c0_g1_i1	1,4-alpha-Glucan-Branching Enzyme	A0A067RAH1
DN2717_c0_g1_i1	Polyadenylate-Binding Protein 4-like	<i>Zootermopsis nevadensis</i> X1WI92
DN8485_c0_g1_i1	Lysine--tRNA ligase isoform X3	<i>Acyrtosiphon pisum</i> J9K9F3
DN10672_c1_g1_i1	Glycerol-3-Phosphate DH isoform 5	<i>Acyrtosiphon pisum</i> J9JMM6
		<i>Acyrtosiphon pisum</i>



Tutti i polipeptidi della saliva riportati in tabella 5.2, annotati confrontando i trascritti delle ghiandole con il database NCBI nr, corrispondono a proteine degli insetti. In particolare, in figura 5.5 sono riportate le quantità relative suddivise per gruppi tassonomici. L'ordine Emitteri è il più rappresentato (65%) ed il 58% delle sequenze concordanti è associato a specie della famiglia Aphididae.

**Taxonomy of Blastp matching sequences**



**Figura 5.5: Tassonomia NCBI nr delle sequenze annotate**

## 5.3 INTERAZIONI TRA LO ZUCCHINO SAN PASQUALE E *APHIS GOSSYPII*

### 5.3.1 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI *A.*

#### *GOSSYPII* – INFESTAZIONE CONTROLLATA

##### 5.3.1.1 Fertilità

Il numero di neanidi deposte in 10 giorni su piante precedentemente infestate non si è differenziato statisticamente da quello prodotto su piante non infestate (Tabella 5.3). Questo è confermato in 3 diversi set di biosaggi, descritti nei paragrafi 4.6.1.1; 4.6.1.2; 4.6.1.3.

**Tabella 5.3.** *Fertilità di Aphis gossypii, valutata come numero di neanidi deposte su foglia precedentemente infestata da 50 neanidi, poi rimosse, in confronto alla fertilità valutata su foglia non infestata. I valori sulle righe si riferiscono a biosaggi differenti, che hanno incluso la misurazione della fertilità con metodica identica (in Materiali & Metodi, par. 4.6.1.1; 4.6.1.2; 4.6.1.3).*

biosaggio	neanidi deposte		ANOVA	
	foglia precedentemente infestata (media $\pm$ ds, n=10)	foglia non infestata (media $\pm$ ds, n=10)	F <sub>1,18</sub>	P
4.6.1.1	39,1 $\pm$ 14,73	42,0 $\pm$ 13	0,21	0,65
4.6.1.2	48,9 $\pm$ 11,63	47,6 $\pm$ 5,64	0,10	0,75
4.6.1.3	46,8 $\pm$ 12,87	47,3 $\pm$ 6,5	0,01	0,90

##### 5.3.1.2 Comportamento di dispersione della progenie

Il comportamento di dispersione è stato valutato come percentuale di neanidi rimaste sulla foglia dove erano state deposte, a confronto con quelle migrate su altre parti della pianta. Sulle piante controllo, non infestate, le neanidi hanno continuato ad alimentarsi sulla foglia dove erano state deposte; Invece, su piante precedentemente infestate, circa la metà degli afidi deposti su foglia precedentemente infestata è rimasta sulla stessa, mentre la rimanente parte si è distribuita su altre parti della pianta (Tabella 5.4). Le 2 tesi sono state messe a confronto con il test G di indipendenza, e la differenza tra le tesi è risultata statisticamente significativa, in 2 diversi esperimenti

che avevano la stessa procedura, relativamente a questo aspetto (4.6.1.2; 4.6.1.3)

**Tabella 5.4:** *Dispersione delle neanidi di Aphis gossypii nate su foglia basale precedentemente infestata, in confronto alla dispersione delle neanidi nate su foglia basale non infestata. La tabella indica la percentuale di neanidi deposte in 10 giorni che rimangono sulla foglia dove sono state deposte. I valori sulle righe si riferiscono a biosaggi differenti (4.6.1.2; 4.6.1.3), che hanno incluso la misurazione del comportamento di dispersione con metodica identica. Per ciascun biosaggio, i valori in tabella rappresentano i totali di dieci repliche per tesi sperimentale. Tra parentesi è riportato il rapporto tra numero di neanidi osservate sulla foglia basale e il totale delle neanidi per pianta.*

biosaggio	distribuzione delle neanidi		Test G	
	foglia precedentemente infestata	foglia non infestata	G <sub>1</sub>	P
4.6.1.2	45,81 % (224/489)	97,27 % (463/476)	365,11	2,17E-81
4.6.1.3	49,36 % (231/468)	97,25 % (460/473)	321,71	6,14E-72

### 5.3.1.3 Durata dello sviluppo

La durata dello sviluppo preimmaginale (da N1 ad adulto) in entrambe le tesi sperimentali è stata di 12 giorni. Raggiunta l'età adulta, tutti gli afidi hanno iniziato la riproduzione entro le 12 ore successive (biosaggio 4.6.1.3).

### 5.3.2 BIOSAGGI PER LA MISURAZIONE DELLA PERFORMANCE BIOLOGICA DI *A. GOSSYPHII* – TRATTAMENTO CON SALIVA

#### 5.3.2.1 Durata dello sviluppo, fertilità e comportamento di dispersione della progenie

Il trattamento della foglia con saliva non ha evidenziato risposte diverse di durata dello sviluppo e fertilità rispetto ai controlli. La durata dello sviluppo preimmaginale (da N1 ad adulto), analogamente a quanto osservato per l'infestazione, è stata di 12 giorni, e tutti gli afidi hanno iniziato la riproduzione entro 12 ore

dall'ultima muta (biosaggio 4.6.2.1). Le neanidi deposte da ciascuna femmina sono indicate in tabella 5.5.

**Tabella 5.5:** *Fertilità di Aphis gossypii (biosaggio 4.6.2.1) valutata come numero di neanidi deposte in 10 giorni su foglia basale trattata con dieta + saliva, in confronto alla fertilità su foglia basale trattata con sola dieta (controllo).*

neanidi deposte		ANOVA ad una via	
saliva + dieta (media $\pm$ ds, n=10)	dieta (media $\pm$ ds, n=10)	F <sub>1,18</sub>	P
47,2 $\pm$ 10,16	46,9 $\pm$ 5,68	0,01	0,93

Invece, la frequenza di distribuzione degli afidi sulla pianta ha fatto registrare differenze statisticamente significative. Circa La metà delle neanidi deposte sulla foglia trattata con saliva (47,46%) ha continuato ad alimentarsi sulla stessa foglia dove era stata deposta, mentre la rimanente parte si è distribuita su altri organi della pianta. Sulle piante controllo trattate solo con dieta, invece, la quasi totalità della progenie ha continuato ad alimentarsi sulla prima foglia vera dove era stato posto il singolo afide adulto (Tabella 5.6).

**Tabella 5.6:** *Dispersione delle neanidi di Aphis gossypii (biosaggio 4.6.2.1) nate su foglia basale trattata con dieta + saliva, in confronto alla dispersione delle neanidi nate su foglia basale trattata solo con dieta. La tabella indica la percentuale di neanidi deposte in 10 giorni che rimangono sulla foglia dove sono state deposte. I valori in tabella rappresentano i totali di dieci repliche per tesi sperimentale. Tra parentesi è riportato il rapporto tra numero di neanidi osservate sulla foglia basale e il totale delle neanidi sull'intera pianta.*

distribuzione delle neanidi		Test G di indipendenza	
dieta + saliva	solo dieta	G <sub>1</sub>	P
47,46 % (224/472)	95,95 % (450/469)	310,36	1,82E-69

### 5.3.2.2 Biosaggi per la misurazione della performance biologica di *A. gossypii* – confronto tra trattamento con saliva e infestazione controllata

Non sono emerse differenze di fertilità nelle quattro tesi sperimentali (Test ANOVA ad una via,  $P=0,97$ ) (Tabella 5.7) (biosaggio 4.6.2.2)

**Tabella 5.7.** Fertilità di *Aphis gossypii* (biosaggio 4.6.2.2) valutata come numero di neanidi deposte in 10 giorni da una singola femmina adulta su foglia basale trattata con saliva in dieta; solo con dieta; precedentemente infestata con 50 neanidi, poi rimosse; non trattata (né infiltrata, né infestata).  $n=10$  per ciascuna delle quattro tesi sperimentali.

neanidi deposte				ANOVA ad una via	
dieta + saliva (media $\pm$ ds)	dieta (media $\pm$ ds)	foglia precedentemente infestata (media $\pm$ ds)	nessun trattamento (media $\pm$ ds)	$F_{3,36}$	$P$
33,5 $\pm$ 5,42	33,4 $\pm$ 5,16	32,7 $\pm$ 3,65	33 $\pm$ 3,52	0,07	0,97

Differenze statisticamente significative tra le quattro tesi si sono avute, invece, per quel che riguarda la frequenza di distribuzione degli afidi sulla pianta (Tabella 5.8). Su piante infiltrate con saliva (tesi 1) e su piante infestate con *A. gossypii* (tesi 3) la proporzione di neanidi che ha continuato ad alimentarsi sulla foglia trattata con saliva è risultata del 25,07% e del 26,61%, rispettivamente, differenziandosi statisticamente da quanto osservato sui controlli, costituiti da piante infiltrate solo con dieta (tesi 2) e piante non trattate (tesi 4), ovvero il 96,4% e il 97,88% della progenie prodotta in 10 giorni, rispettivamente. Invece, non sono emerse differenze statisticamente significative tra tesi 1 e tesi 3, e tra tesi 2 e tesi 4 (Tabella 5.8).

**Tabella 5.8.** *Dispersione delle neanidi di Aphis gossypii (biosaggio 4.6.2.2) nate su foglia che ha ricevuto i trattamenti: infiltrazione con saliva in dieta; infiltrazione solo con dieta; precedente infestazione con 50 neanidi, poi rimosse; nessun trattamento (controllo). La tabella mostra la percentuale di neanidi rimaste sulla foglia, rispetto al numero di neanidi deposte in 10 giorni; le altre neanidi hanno migrato su altre parti della pianta. I valori in tabella rappresentano i totali di dieci repliche per tesi sperimentale. Tra parentesi è riportato il rapporto tra numero di neanidi osservate sulla foglia basale e il totale delle neanidi per pianta. Lettere diverse indicano differenza statisticamente significativa per  $P < 0,0001$ .*

neanidi deposte				Test G di indipendenza	
saliva + dieta	dieta	precedente infestazione	nessun trattamento	G <sub>3</sub>	P
25,38 % a (83/327)	95,11 % b (311/327)	24,54 % a (80/326)	98,09 % b (308/314)	816,18	1,34E-176

### 5.3.2.3 Biosaggi per la misurazione della performance biologica di A. gossypii-risposta sistemica

Non sono emerse differenze statisticamente significative tra il numero di neanidi deposte sulla foglia apicale di piante la cui foglia basale aveva ricevuto i trattamenti: saliva in + dieta zuccherina (tesi 1); solo dieta (tesi 2); precedente infestazione con 50 neanidi, poi rimosse (tesi 3); nessun trattamento (tesi 4) (Test ANOVA ad una via,  $P=0,92$ ) (Tabella 5.9).

**Tabella 5.9:** *Fertilità di Aphis gossypii (biosaggio 4.6.3) valutata come numero di neanidi deposte da una singola femmina adulta sulla foglia apicale di una pianta la cui foglia basale aveva ricevuto i trattamenti: saliva + dieta; solo dieta; infestazione con 50 neanidi, poi rimosse; nessun trattamento). n=10 per ciascuna delle quattro tesi sperimentali.*

neanidi deposte su foglia apicale				ANOVA ad una via	
foglia basale saliva + dieta (media ± ds)	foglia basale dieta (media ± ds)	foglia basale afidi rimossi (media ± ds)	foglia basale nessun trattamento (media ± ds)	F <sub>3,36</sub>	P
32,7 ± 6,54	32,7 ± 4,90	32,6 ± 4,62	31,4 ± 3,30	0,16	0,92

Differenze statisticamente significative si sono avute, invece, per quel che riguarda la frequenza di distribuzione degli afidi sulla pianta (Test G,  $P=0$ ) (Tabella 5.10). Su piante trattate con saliva (tesi 1) e su piante infestate con *A. gossypii* (tesi 3) la progenie dei singoli afidi ha continuato ad alimentarsi sulla foglia apicale in media per il 23,5% e il 24,5%, rispettivamente, mentre la rimanente parte si è distribuita su altri organi della pianta. Invece, sulle piante infiltrate solo con dieta zuccherina (tesi 2) e su piante non trattate (tesi 4) il 95,4% e il 98,1% della progenie, rispettivamente, ha continuato ad alimentarsi sulla foglia apicale, dove era stato posto a riprodursi il singolo afide adulto. Non sono emerse differenze statisticamente significative tra tesi 1 e tesi 3, e tra tesi 2 e tesi 4 (Tabella 5.10).

**Tabella 5.10:** *Dispersione delle neanidi di Aphis gossypii (biosaggio 4.6.3) nate su foglia apicale di piante la cui foglia basale aveva ricevuto i trattamenti: infiltrazione con saliva + dieta; infiltrazione con dieta; precedente infestazione con 50 neanidi, poi rimosse; nessun trattamento. La tabella mostra la percentuale di neanidi rimaste sulla foglia apicale, rispetto al numero di neanidi migrate su altri organi della pianta. I valori in tabella rappresentano i totali di dieci repliche per tesi sperimentale. Tra parentesi è riportato il rapporto tra numero di neanidi osservate sulla foglia apicale e il totale delle neanidi per pianta. Lettere diverse indicano differenza statisticamente significativa per  $P<0,0001$ .*

neanidi deposte/femmina adulta su foglia apicale non trattata				Test G di indipendenza	
foglia basale infiltrata con saliva (media $\pm$ ds)	foglia basale infiltrata con dieta (media $\pm$ ds)	foglia basale precedentemente infestata (media $\pm$ ds)	foglia basale non trattata (media $\pm$ ds)	$G_3$	$P$
25,38 % a (83/327)	95,11 % b (311/327)	24,54 % a (80/326)	98,09 % b (308/314)	816,18	1,34E-176

#### 5.4 RISPOSTA DELLA PIANTA DI ZUCCHINO AD INFESTAZIONI CONTROLLATE DI *A. GOSSYPII*

L'analisi di espressione volta alla valutazione della regolazione delle vie del salicilato in pianta è stata progettata a supporto delle evidenze biologiche raccolte sulla dispersione degli afidi. A tale scopo, è stata effettuata una estrazione di RNA totale da foglia di piante di zuccchino infestate per 48 ore con afidi. Su ogni foglia sono stati posizionati 10 afidi adulti che sono stati lasciati alimentare per 48 ore, sono poi stati eliminati in modo da raccogliere il materiale vegetale da cui è stata fatta l'estrazione di RNA. La valutazione della qualità dell'RNA estratto è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica realizzata con il Nanodrop (Thermo Scientific). La tabella 5.11 mostra un esempio di valutazione qualitativa degli RNA estratti.

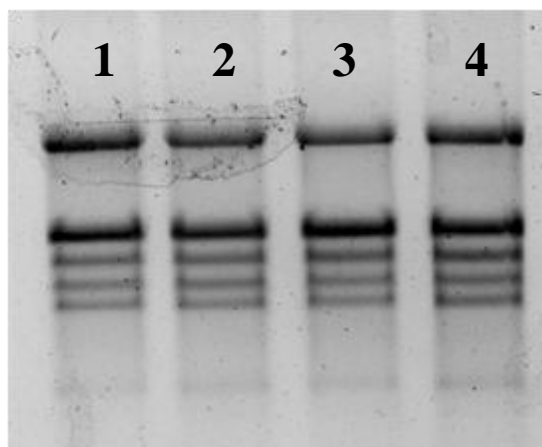
**Tabella 5.11** *Valutazione qualitativa RNA estratto*

Sample	Concentration [ng/ $\mu$ l]	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
Controllo 1	1003,76	2,22	2,20
Controllo 2	975,32	2,22	2,21
Controllo 3	1185	2,21	2,20
Infestato 1	800,05	2,24	2,21
Infestato 2	1158,01	2,22	2,20
Infestato 3	777,23	2,23	2,21

Tutti i campioni hanno presentato concentrazioni ridotte di proteine e di inquinanti quali fenoli, carboidrati e composti aromatici. Infatti tutti i campioni hanno presentato un indice di purezza alto ( $A_{260}/A_{280}$ ) molto vicino a 2 che è attribuito all'RNA puro e una torbidità della soluzione pressoché nulla, stimata con l'assorbanza a

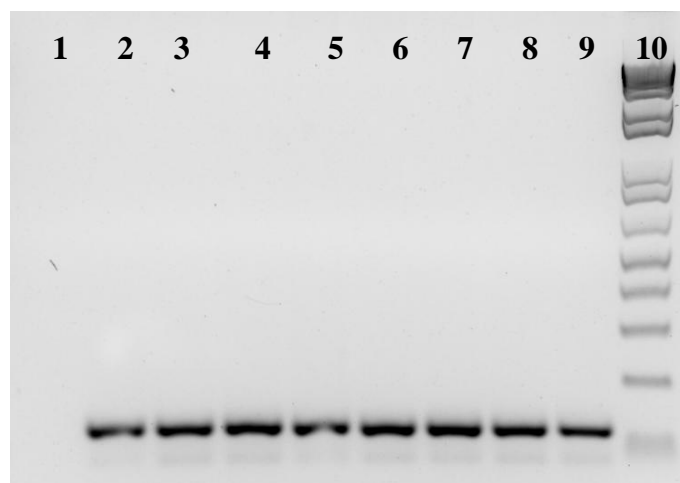


320 nm (non mostrata). Una valutazione del livello di integrità dell'RNA estratto è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 1,2 % (p/v) che ha mostrato le bande dell'RNA ribosomiale integre (Figura 5.6).



**Figura 5.6:** *Valutazione della qualità dell'RNA estratto. Elettroforesi su gel di agarosio 1.2% di 5 µg di alcuni campioni di RNA*

L'integrità dell'RNA è valutabile dalla presenza di bande nette, ben definite e una buona qualità è garantita quando la prima banda dall'alto verso il basso (RNA ribosomiale 25S) e la terza banda (RNA ribosomiale 18S) presentano fluorescenza rispettivamente una il doppio dell'altra. In seguito, è stato effettuato un trattamento con DNAsi per allontanare contaminazioni di DNA ed è stata poi effettuata la sintesi del primo filamento di cDNA. L'avvenuta sintesi del primo filamento di cDNA è stata verificata mediante amplificazione di una porzione del gene EF1- $\alpha$ , espresso costitutivamente in tutti i tessuti vegetali (Pokalsky *et al.*, 1989). La figura 5.7 mostra il risultato della PCR di controllo che dimostra che per tutti i campioni è stata effettuata con successo la sintesi del primo filamento di cDNA.



**Figura 5.7:** Controllo della sintesi del cDNA. Amplificazione di una porzione del gene costitutivo *EF1 $\alpha$*  sui cDNA sintetizzati a partire da RNA estratto da campioni fogliari infestati da afidi e relativi controlli non infestati. Pozzetto 1: controllo negativo PCR, Pozzetti 2-9: ampliconi ottenuti da un gruppo di campioni di cDNA, Pozzetto 10: marcatore di peso molecolare 1kb + (Life Technologies).

Il cDNA ottenuto è stato impiegato per l'analisi di espressione mediante Real Time RT-PCR volta a verificare i cospicui dati disponibili in letteratura sul coinvolgimento del salicilato nelle interazioni pianta-afide. A tale scopo è stata monitorata l'espressione di un gruppo di geni coinvolti sia nella biosintesi dell'acido salicilico sia nella trasduzione dei segnali da esso mediati. Sono stati analizzati i seguenti geni:

- *Isochorismate synthase 1 (ICS1)* (AT1G74710.2) che catalizza la reazione di conversione del corismato in isocorismato nella via biosintetica plastidiale dell'acido salicilico (SA) (Loake and Grant, 2007);
- *4-coumarate-CoA ligase 1 (4CL1)* (AT1G51680.1) che è coinvolto nella conversione del 4-Cinnamic acid in 4-Coumaroyl-CoA nella via biosintetica dei fenilpropanoidi (Dempsey *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016);
- *Pathogenesis-related Thaumatin-like protein 1b (PR5-1b)* e *Thaumatin-like protein (PR5)* (AT4G38660.1, AT1G18250.2) la cui

espressione viene indotta in maniera SA-dipendente, in seguito alla percezione dello stress (Kusnierczyk *et al.*, 2008);

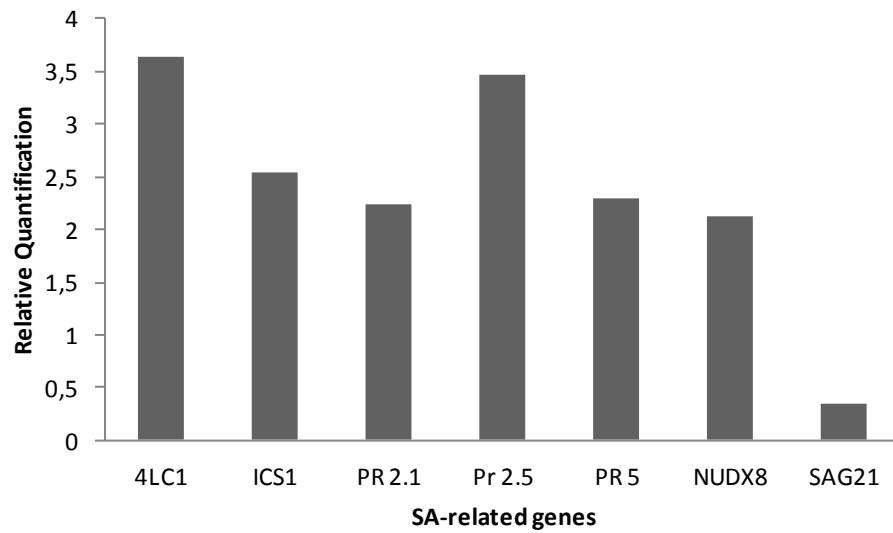
- *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 12 (PR-2.12)* e *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 7 (PR-2.7)* (AT2G05790.1, AT4G34480.1) che sono espressi in seguito alla percezione di uno stress di natura biotica, e sono coinvolti nella degradazione di componenti della parete cellulare (van Loon *et al.*, 2006);

- *Nudix hydrolase 8 (NUDX8)* (AT5G47240.1) presenta attività idrolasica nei confronti di nucleosidi difosfato, come ADP-ribosio, e NADH, che sono intermedi metabolici chiave nella risposta di difesa delle piante (Fonseca e Dong, 2014);

- *Senescence-associated gene 21 (SAG21)* (AT4G02380.1) coinvolto nel processo di senescenza fogliare, la cui espressione è indotta in seguito ad attacco da parte di afidi (Kusnierczyk *et al.*, 2008).

I valori di espressione genica sono stati calcolati mediante il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001) che rilascia l'indice RQ (*Relative Quantification*). Dopo aver stabilito una fluorescenza soglia definita *threshold* viene calcolato il ciclo soglia (Ct) per ogni gene, cioè il numero di cicli a cui il gene di interesse raggiunge la suddetta fluorescenza. I valori di Ct ottenuti sia per il gene endogeno "normalizzatore" sia per i geni di interesse vengono utilizzati per calcolare le differenze di fluorescenza sia nel calibratore che nei campioni in analisi, ottenendo i relativi  $\Delta Ct$ . Infine, la quantificazione relativa per ogni gene si ottiene sottraendo il  $\Delta Ct$  del campione al  $\Delta Ct$  del calibratore ( $\Delta\Delta Ct$ ).

Dopo 48 ore di infestazione afidica questi geni risultano tutti indotti, indicando che l'acido salicilico e il pathway da esso regolato sono coinvolti nelle interazioni tra la pianta di zuccino e gli afidi (Figura 5.8).



**Figura 5.8:** *Quantificazione relativa di geni coinvolti nel pathway dell'acido salicilico mediante Real Time RT-PCR in piante di zuccino infestate da afidi. La quantificazione dei trascritti è stata ottenuta mediante calibrazione su piante non infestate.*

## 6. DISCUSSIONE

### 6.1 LA SPECIE

Esistono difficoltà di identificazione tassonomica per *Aphis gossypii* (Blackman and Eastop, 2007; Lagos-Kutz *et al.*, 2014). Quest'ultima specie è inclusa nel gruppo *frangulae*, del quale una ventina di specie simili morfologicamente sono state descritte per l'Europa (Stroyan, 1984; Heie, 1986). Il DNA barcoding, che utilizza la sequenza del gene COI (Hebert *et al.*, 2004; Hajibabaei *et al.*, 2007) rappresenta una metodica efficace, alternativa all'identificazione morfologica delle specie criptiche di afidi (Footitt *et al.*, 2008; Rebijith *et al.*, 2013; Coeur d'acier *et al.*, 2014) ed è stato utilizzato con successo per discriminare *A. gossypii* dalle altre specie del gruppo *frangulae* (Carletto *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Lagos-Kutz *et al.*, 2014). Nel presente studio l'approccio seguito per l'identificazione morfologica prima, e molecolare poi, ha consentito di attribuire con certezza ad *A. gossypii* la popolazione utilizzata nel corso dell'attività sperimentale. In particolare, la regione sequenziata del gene COI ha evidenziato la più elevata identità (99-100%) con le sequenze del gene COI di *A. gossypii* disponibili in GenBank, mentre la percentuale di identità nei confronti della stessa regione COI di *A. frangulae*, la specie morfologicamente più simile ad *A. gossypii*, è risultata del 98%.

### 6.2 ANALISI TRASCRITTOMICA E PROTEOMICA DELLA SALIVA

In questo lavoro è stato seguito un approccio di tipo trascrittomico / proteomico: il risultato dell'analisi bioinformatica sulle ghiandole salivari è stato messo a confronto con i risultati dell'analisi proteomica della componente acquosa della saliva di *A. gossypii*. Questo è un approccio che in letteratura è stato utilizzato per studiare le ghiandole annesse all'apparato riproduttore di Imenotteri parassitoidi ed il veleno iniettato dai parassitoidi nel corso

dell'ovideposizione (Avolio, 2015; Laurino *et al.*, 2016), e per studiare, come in questo caso, ghiandole salivari e saliva (Carolan *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2013). Il confronto tra il trascrittoma delle ghiandole salivari ed il proteoma del loro secreto consente di identificare, tra le sequenze di RNA, quelle corrispondenti a regioni effettivamente tradotte. Il risultato di questo studio è presentato in una versione preliminare. Infatti, di tutte le bande evidenziate nell'elettroforesi della saliva, solo le proteine delle prime otto, quelle a più alto peso molecolare, sono state identificate fino a questo momento, per un totale di 46 proteine. La maggior parte delle proteine annotate per la saliva di *A. gossypii* corrisponde a proteine precedentemente identificate in afidi (il 58 %), e non sorprende che il più abbondante sia *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Omottero, Aphidinae) (48 % rispetto al totale), il primo insetto eterometabolo di cui è stato pubblicato il genoma (The International Aphid Genomics Consortium, 2010). Le proteine salivari di *A. gossypii* fin qui annotate appartengono a svariate categorie funzionali, e partecipano a processi biologici diversi.

La presenza di glucosio deidrogenasi è stata rilevata in campioni di saliva di tutte le specie di afidi per cui sono noti studi sul proteoma salivare quali: *A. pisum*, *M. persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Omottero, Aphidinae), *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Omottero, Aphidinae), *S. avenae*, *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Omottero, Aphidinae), *Schizaphis graminum* (Rondani) (Omottero, Aphidinae). Le glucosio deidrogenasi sono ossidoriduttasi coinvolte nella risposta immunitaria degli insetti e intervengono in processi di detossificazione e, più in generale, nella soppressione delle difese della pianta (Rao *et al.*, 2013).

Altri enzimi con un ruolo nella modulazione delle difese della pianta sono le perossidasi, coinvolte nella risposta allo stress ossidativo, e che risultano in grado di favorire la colonizzazione da parte degli afidi, sfruttando un meccanismo analogo a quanto

osservato per alcuni batteri patogeni. Come in *A. gossypii*, la presenza delle perossidasi è stata osservata nel caso della saliva di diverse specie di afidi, sia da un punto di vista molecolare che dell'attività enzimatica (Chen *et al.*, 2005).

Possibili modulatori delle difese della pianta presenti nella saliva di *A. gossypii* (e riscontrati anche in *M. euphorbiae*, *A. pisum*, *D. noxia*, e *S. graminum*) sono le apolipoforine. Le apolipoforine sono coinvolte nel metabolismo delle lipoproteine, nel trasporto dei lipidi e nella risposta immunitaria degli insetti ad alcuni microrganismi patogeni. Grassi e acidi grassi rappresentano delle molecole-segnale a cui le apolipoforine possono legarsi, interferendo così con la risposta immunitaria della pianta (Nicholson *et al.*, 2012).

Le proteine aminopeptidasi N-like, conosciute per il loro ruolo nel turnover proteico e nel catabolismo dei peptidi bioattivi, sono qui state identificate nella saliva di *A. gossypii*, così come già noto per la saliva di altri afidi (Vandermoten *et al.*, 2014). La presenza delle aminopeptidasi suggerisce un ruolo di questi enzimi nella degradazione delle proteine della pianta ospite e in processi di detossificazione.

Due diverse proteine, identificate nella banda otto del profilo proteico di *A. gossypii* hanno funzione di componenti cellulari e sono presenti anche in *A. pisum*. Nella stesso gruppo, glicerolo 3-fosfato deidrogenasi lega gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , e questo può avere un ruolo importante nell'abilità degli afidi a sopprimere la risposta di difesa della pianta (Van Bel and Will, 2016). Una nucleasi segnalata nella banda 4, secondo la classificazione GO, entra nel processo biologico di silenziamento genico mediato da RNA (Jiang *et al.*, 2011), e si potrebbe ipotizzare anche qui un ruolo di sabotaggio delle difese della pianta (però è un'ipotesi speculativa).

Sono presenti nella saliva di *Aphis gossypii* anche proteine non caratterizzate, quali ossidoreduttasi, idrolasi e peptidasi; tra le proteine non caratterizzate anche una putative sheath protein già

identificata nella saliva di *Sitobion avenae* (Fabricius) (Omottero, Aphididae) (Rao *et al.*, 2013) ed un peptide segnale di *A. pisum* (Jiang *et al.*, 2010). Proteine non caratterizzate risultano piuttosto comuni tra gli studi sul sialoma in varie specie di afidi, e la loro presenza o assenza nella saliva può riflettere lo spettro dei diversi ospiti vegetali (Chaudhary *et al.*, 2015). Va tenuto presente anche l'effetto dei diversi approcci sperimentali. Nel nostro caso, la dieta artificiale utilizzata per raccogliere la saliva è stata una semplice soluzione acquosa di saccarosio, e in letteratura è noto l'effetto fagostimolante del saccarosio per gli afidi (Douglas, *et al.*, 2006), ma i componenti della dieta possono avere un impatto sulla salivazione, e di conseguenza su quantità e varietà di proteine ottenute, per esempio Chaudhary *et al.* (2014) hanno utilizzato resorcinolo come neurostimolante, ottenendo più proteine nella saliva raccolta. Le proteine non ancora caratterizzate rappresentano un'importante fonte di possibili effettori nella saliva degli afidi e studiarle può aiutarci a capire come avviene l'attacco alla pianta da parte di questi emitters, che possono alimentarsi nello stesso sito a lungo ed abbondantemente.

### **6.3 INTERAZIONE TRA *APHIS GOSSYPHII* E LO ZUCCHINO SAN PASQUALE**

In tempi piuttosto recenti, è stata presentata la possibilità che infestazioni precedenti agissero come vaccinazioni per la pianta, inducendo una successiva risposta di resistenza (Kessler & Baldwin, 2002). Relativamente all'interazione con gli afidi, un'induzione di resistenza è stata osservata in diversi casi e l'infestazione precedente ha generato un effetto negativo sulla performance degli afidi. E' il caso dell'induzione di resistenza di *M. persicae* su *Arabidopsis thaliana*, indotta da infestazione e da applicazione di saliva (De Vos & Jander, 2009), dello stesso *M. persicae* su pesco (Sauge *et al.*, 2012), di *R. padi* e *S. avenae* su grano e mais (Thackray *et al.*, 1988). Anche



Prado e Tjallingii (1997) riportano che un'infestazione precedente di afidi cospecifici peggiora l'accettazione della pianta da parte di *R. padi*, come anche Messina *et al.* (2002), per *R. padi* su grano. De Vos e Jander (2009) citano comunicazioni personali di Tjallingii e di Edwards relative ad afidi, rispettivamente su patata selvatica e *Medicago truncatula*.

In questo lavoro, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi nei biosaggi di infestazione controllata dello zucchini non hanno evidenziato alcun impatto sui principali parametri biologici dell'afide. Infatti, il tempo di sviluppo fino allo stadio adulto, la fertilità e la longevità sono risultati simili su piante precedentemente infestate e su piante controllo. In letteratura è riportata una casistica estremamente variabile, a seconda dei sistemi pianta-afide studiati. Analogamente a quanto è stato osservato nell'interazione qui presentata tra *A. gossypii* e zucchini, non risultano differenze apprezzabili nei parametri biologici anche in altri sistemi studiati. Ad esempio, non hanno impatto sulla fitness degli afidi infestazioni precedenti di *R. padi* (Gianoli, 1999) e *D. noxia* (Messina *et al.*, 2012) su grano.

Al contrario, diversi autori hanno riportato un miglioramento di alcune prestazioni degli afidi: Takemoto *et al.* (2013), osservano un incremento della fitness di *A. pisum* su piante di fava precedentemente infestate, con fertilità inalterata ma tempi di sviluppo più brevi, e mettono in relazione questo aumento di fitness con la minore produzione di JA osservata, che partecipa ad una modulazione reciproca con SA. Anche *Sipha flava* (Forbes) su sorgo (Gonzales *et al.*, 2002), *Therioaphis trifolii* (Monell) su erba medica (Jiang, 1996) e *M. persicae* su cavolo cinese (Cao *et al.*, 2016) migliorano la loro performance su piante precedentemente infestate. Infine, *A. fabae* dopo un'infestazione precedente di cospecifici migliora l'accettazione della pianta (Prado & Tjallingii, 1997).

Pur in assenza di impatto sui parametri biologici più comunemente utilizzati, l'interazione tra *A. gossypii* e zuccchino San Pasquale ha mostrato un effetto inaspettato, perché ha indotto negli afidi un comportamento dispersivo. Sulle piante controllo le neanidi neo-deposte rimangono nei pressi della madre, sulla stessa foglia dove sono nate, mentre sulle piante trattate la maggior parte delle neanidi si allontana dalla foglia precedentemente infestata (cioè dal sito di nascita) per disperdersi sull'intera pianta. E' di particolare interesse il fatto che questa dispersione avvenga anche quando il trattamento consiste nell'applicazione di saliva. Similmente a quanto registrato da noi, infestazioni precedenti di *R. padi* su grano, pur non avendo un impatto sulla fertilità, influenzano la distribuzione degli afidi sulla pianta (Gianoli, 1999). Lo stesso comportamento di dispersione delle neanidi neonate di *A. gossypii* è stato osservato su piante trattate con infestazione di afidi o applicazione di saliva sulla foglia basale e riproduzione della femmina adulta sulla foglia apicale non trattata, dalla quale le neanidi neonate si disperdevano verso gli altri organi della pianta, suggerendo una risposta della pianta di tipo sistemico.

Numerosi studi hanno dimostrato che durante l'attacco di fitomizi viene innescato il ciclo metabolico dell'acido salicilico (Van Poecke & Dicke, 2004; Zhao *et al.*, 2009) che, come altri ormoni vegetali, svolge un ruolo essenziale nella regolazione della crescita e dello sviluppo delle piante (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011), ed è coinvolto anche nell'attivazione delle difese indirette contro gli insetti (Khan *et al.*, 2015). La letteratura riporta che il metil-salicilato (MeSA), derivato metilico del fitormone acido salicilico, è responsabile, tra l'altro, in diversi sistemi pianta / afide, del comportamento di fissaggio alterato delle neanidi, ad esempio in *M. euphorbiae* (Digilio *et al.*, 2012), *A. fabae* (Hardie *et al.*, 1994) e *R. padi* (Glinwood *et al.*, 2007). Questo è in accordo con i nostri risultati dell'analisi trascrittomica delle piante attaccate da afidi, dove è stata

osservata la sovraespressione di geni coinvolti nella biosintesi del salicilato, quali isochorismate synthase 1 e 4-coumarate-CoA ligase 2, oltre a diversi geni responsivi al salicilato. Il comportamento di allontanamento degli afidi indotto da MeSA ha un preciso significato biologico, tendendo ad allontanare le forme migranti sia dall'ospite invernale che da piante ormai esaurite, verso nuove piante da colonizzare (Glinwood & Pettersson, 2000). Sarà interessante confermare se una simile regolazione dell'espressione genica avvenga anche in seguito ad applicazione di saliva, dato il comportamento simile elicitato, e se il trattamento dello zucchini con MeSA induca la stessa alterazione comportamentale in *A. gossypii*. Il comportamento di dispersione delle neanidi neonate di *A. gossypii* su zucchini, indotto da una precedente infestazione o dal trattamento con saliva, potrebbe essere tradotto come conseguenza di una risposta di difesa della pianta per consentire l'allontanamento degli afidi da piante già oggetto di infestazione, onde limitare gli effetti debilitanti legati ad una eccessiva attività trofica. Allo stesso tempo questo comportamento di dispersione potrebbe essere una risposta adattativa di *A. gossypii*, ad un meccanismo di difesa della pianta, che consentirebbe all'afide di colonizzare piante o organi di maggiore valore nutrizionale.

## 7. CONCLUSIONI

La saliva degli afidi rappresenta un'importante fonte di composti capaci di mediare il rapporto tra questi insetti e la pianta ospite. La saliva risulta particolarmente interessante data la capacità degli afidi di alimentarsi senza innescare risposte di difesa della pianta evidenti come per altri erbivori, caratteristica conferita proprio dagli effettori rilasciati con la saliva. La dispersione degli afidi sulla pianta, sintomo

che segue sia l'infestazione controllata, sia il trattamento con saliva, ha dimostrato che responsabili del comportamento osservato sono componenti della saliva, che probabilmente agiscono attraverso l'induzione del ciclo metabolico del salicilato. I componenti responsabili di questa alterazione non sono stati identificati nel corso di questo lavoro di tesi, ma verranno studiati in seguito.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez A. E., Tjallingii W. F., Garzo E., Vleeshouwers V., Dicke M., Vosman B. 2006. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121: 145–157
- Arimura, G., Ozawa, R., Kugimiya, S., Takabayashi, J. and Bohlmann, J. 2004. Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (E)-j3-Ocimene and Transcript Accumulation of (E)-f3-Ocimene Synthase in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 135:1 976-1983.
- Atamian, H. S., Chaudhary, E., Dal Cin, V., Bao, E., Girke, T. and Kaloshian, I. (2013). In planta expression of potato aphid *Macrosiphon euphorbiae* effectors Me10 and Me23 enhances aphid fecundity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26: 67–74. doi: 10.1094
- Avolio, M. 2015. Università degli studi di Napoli Federico II, Tesi di dottorato. Functional and molecular analysis of venom produced by the ectoparasitoid *Bracon nigricans*. <http://www.fedoa.unina.it/10231/>
- Blackman, R. L., Eastop, V. F. 2007. Taxonomic issues. In: van Emden HF, Harrington R (Eds) *Aphids as Crop Pests*. CAB International, Oxfordshire. pp. 1–29.
- Bos, J. I. B., Prince, D., Pitino, M., Maffei, M. E., Win, J. and Hogenhout, S. A. 2010. A Functional Genomics Approach Identifies Candidate Effectors from the Aphid Species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid). *PLoS Genet* 6(11): e1001216. doi:10.1371/journal.pgen.1001216
- Bruinsma M. and Dicke M. 2008. Herbivore-Induced Indirect Defence: from induction mechanisms to community ecology. In: *Induced plant resistance to herbivory*, A. Schaller (Ed.), Springer Science+Business Media B.V. pp. 31-60.
- Carletto, J., Blin, A. and Vanlerberghe-Masutti. F. 2009. DNA-based discrimination between the sibling species *Aphis gossypii* Glover and *Aphis frangulae* Kaltenbach. *Systematic Entomology* 34: 307–314
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E. and Alberto Fereres. 2014. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Res.* 186: 38–46.
- Carolan, J. C., Caragea, D., Reardon, K. T., Mutti, N. S., Dittmer, N. and Pappan, K. 2011. Predicted effector molecule in the salivary secretome of the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*): a dual

- transcriptomic/proteomic approach. *J. Proteome Res.* 19: 1505–1518. doi: 10.1021
- Chaudhary, R., Atamian, H. S., Shen, Z., Briggs, S. P. Kaloshian, I. 2014. GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *PNAS* 111: 8919–8924.
- Chaudhary, R., Atamian, H. S., Shen, Z., Briggs, S. P. and Kaloshian, I. 2015. Potato Aphid Salivary Proteome: Enhanced Salivation Using Resorcinol and Identification of Aphid Phosphoproteins. *J. Proteome Res.* 14: 1762–1778.
- Chen H., Wilkerson C. G., Kuchar J.A., Phinney B. S. 2005. Howe G.A. Jasmonate inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *PNAS* 102: 19237–19242.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. and Fan, B. 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling & Behavior* 4: 493-496.
- Coeur d’acier, A., Cruaud, A., Artige, E., Genson, G., Clamens, A. L., Pierre, E., Hudaverdian, S., Simon, J. C., Jousselin, E. and Rasplus, J. Y. 2014. DNA barcoding and the associated PhylAphidB@se website for the identification of European aphids (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE* 9, e97620. doi: 10.1371
- Constabel, C. P., Yip, L., Patton, J. J. and Christopher, M. E. 2000. Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology* 124: 285-295.
- Cooper, W. C., Jia, L. and Goggin, F. L. 2004. Acquired and r-gene-mediated resistance against the potato aphid in tomato. *Journal of Chemical Ecology* 30: 2527-2542.
- Cooper, W., Dillwith, W. and Puterka, G. J. 2010. Salivary Proteins of Russian Wheat Aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 39: 223-231.
- Coppola, V., Coppola, M., Rocco, M., Digilio, M.C., D’Ambrosio, C., Renzone, G., Martinelli, R., Scaloni, A., Pennacchio, F., Rao and Corrado, G. 2013. Transcriptomic and proteomic analysis of a compatible tomato-aphid interaction reveals a predominant salicylic acid-dependent plant response. *BMC Genomics* 14: 1471-2164
- De Moraes C. M., Mescher M. C., Tumlinson J. H. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature* 410: 577–80.

- Degenhardt J., Gershenzon J., Baldwin I. T. and Kessler A. 2003. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 169-176.
- De Vos, M. and Jander, G. 2009. *Myzus persicae* (Green Peach Aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell and environment* 32: 1548-1560.
- Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D. and Posthumus, M. A. 1999. Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1907–1922 .
- Dicke, M., van Loon, J. J. A. and Soler, R. 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. *Nature Chemical Biology* 5: 317-324
- Digilio, M. C., Corrado, G., Sasso, R., Coppola, V., Iodice, L., Pasquariello, M., Bossi, S., Maffei, M. E., Coppola, M., Pennacchio, F., Rao, R. and Guerrieri, E. 2010. Molecular and chemical mechanisms involved in aphid resistance in cultivated tomato. *New Phytologist* 187: 1089–1101.
- Digilio, M. C., Cascone, P., Iodice, L. and Guerrieri, E. 2012. Interactions between tomato volatile organic compounds and aphid behavior. *Journal of Plant Interactions* 4: 322-325.
- Douglas A. E., Price, D. R., Minto, L. B., Jones, E., Pescod, K. François, C. L. M. J., Pritchard, J. and Boonham, N. 2006. Sweet problems: insect traits defining the limits to dietary sugar utilisation by the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *The Journal of Experimental Biology* 209: 1395-1403.
- Elzinga, D. A., De Vos, M. and Jander, G. 2014. Suppression of Plant Defenses by a *Myzus persicae* (Green Peach Aphid) Salivary Effector Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 747–756.
- Felton, G.W. and Eichenseer, H. 1999. Herbivore saliva and its effects on plant defense against herbivores and pathogens. In AA Agrawal, S Tuzun, E Bent, eds, *Induced Plant Defenses against Pathogens and Herbivores: Ecology and Agriculture*. American Phytopathology Society Press, St. Paul. pp 19–36
- Fidantsef, A. L., Stout, M. J., Thaler, J. S., Duffey, S. S. and Bostock, R. M. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 97:114.

- Footitt, R. G., Maw, H. E. L., von Dohlen, C. D. and Hebert, P. D. N. 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources* 8: 1189–1201.
- Gianoli, E. 1999. Within-plant distribution of *Rhopalosiphum padi* on wheat seedlings is affected by induced responses. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 227–230.
- Glinwood, R and Pettersson, J. 2000. Change in response of *Rhopalosiphum padi* spring migrants to the repellent winter host component methyl salicylate. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94: 325–330.
- Glinwood, R., Gradin, T., Karpinska, B., Ahmed, E., Jonsson, L. M. V. and Ninkovic, V. 2007 Aphid Acceptance of Barley Exposed to Volatile Phytochemicals Differs Between Plants Exposed in Daylight and Darkness. *Plant Signaling & Behavior* 2: 321–326.
- Gonzales, W. L., Ramirez, C. C., Olea, N. and Niemeyer, H. M. 2002. Host plant changes produced by the aphid *Sipha flava*: consequences for aphid feeding behaviour and growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 103: 107–113.
- Green, T.R., and Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense against insects. *Science* 175:776–777.
- Guerrieri, E., Poppy, G. M., Powell, W., Rao, R. and Pennacchio, F. 2002. Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1703–1715.
- Guerrieri, E. and Digilio, M. C. 2008. Aphid-plant interaction: a review. *Journal of Plant Interaction* 4: 223–232.
- Hattori, M. and Sakaki, Y. 1986. Dideoxy sequencing method using denaturated plasmid templates. *Analytical Biochemistry* 152: 232–238.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. and Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements Taxonomy, molecular phylogenetics and opulation genetics. *Trends in Genetics* 23: 167–172.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. and Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly, *Astrartes fulgurator*. *PNAS* 101: 14812–14817.



- Heie, O. 1986. The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. III Family Aphididae: subfamily Pterocommatinae and tribe Aphidini of subfamily Aphidinae. *Fauna Entomologica Scandinavica* 3: 1–314.
- Heil, M. 2007. Indirect defence via tritrophic interaction. *New Phytologist* 178: 41–61.
- Howe, G. A. and Jander, G. 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41–66.
- Jiang, F., Ramanathan, A., Miller, M. T., Tang, G. C., Gale, M., Patl, S. S. and Marcotrigiano, J. 2011. Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* 479: 423–437.
- Kaloshian, I. and Walling, L. L. 2005. Hemipterans as plant pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology* 43: 491–521.
- Khan, M. I., Fatma, M., Per, T. S., Anjum N. A. and Khan. N. 2015 Salicylic acid induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science* 6: 462. doi:10.3389/fpls.2015.00462
- Kessler, A. and Baldwin, I. T. 2002. Plant responses to insect herbivory. *The Emerging Molecular Analysis* 53: 299–328.
- Kopke, D., Schroder, R., Fischer, H. M., Gershenzon, J., Hilker, M. and Schmidt, A. 2008. Does egg deposition by herbivorous pine sawflies affect transcription of sesquiterpene synthases in pine? *Planta* 228: 427–438.
- Kost C. and Heil M. 2005. Increased availability of extrafloral nectar reduces herbivory in Lima bean plants (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae). *Basic and Applied Ecology* 6: 237–248
- International Aphid Genome Consortium. 2010. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol* 8(2): e1000313. doi:10.1371/journal.pbio.1000313
- Lagos-Kutz, D., Favret, C., Giordano, R. and Voegtlin, D. J. 2014. Molecular and morphological differentiation between *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera, *Aphididae*) and related species, with particular reference to the North American Midwest. *ZooKeys* 459: 49–72.
- Laurino, S., Grossi, G., Pucci, P., Flagiello, A., Bufo, S.A., Bianco, G., Salvia, R., Vinson, S.B., Vogel, H., and Falabella, P. 2016. Identification of major *Toxoneuron nigriceps* venom proteins using an integrated transcriptomic/proteomic approach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 76: 49–61.

- Lecoq, H., and Desbiez, C. 2012. Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. *Advances in Virus Research* 84: 67–126.
- Lee, W., Kim, H., Lim, J., Choi, H-R., Kim, Y., Kim, Y-S., Ji, J-Y., Foottit, R. G. and Lee, S. 2011. Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set. *Molecular Ecology Resources* 11: 32–37.
- Mauck, K. E., De Moraes, C. and Mescher M. C. 2009. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *PNAS* 107: 3600–3605.
- McDonald J.H. 2014. Handbook of Biological Statistics. <http://www.biostathandbook.com/gtestind.html>
- Messina, F. J., Taylor, R. and Karren M. E. 2002. Divergent responses of two cereal aphids to previous infestation of their host plant. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 16: 43–50
- Miller, G. L. and Foottit, R. G. 2009. The taxonomy of crop pests: the aphids. pp. 463–473 in Foottit, R.G. & Adler, P.H. (Eds) *Insect Biodiversity: Science and Society*. Oxford, Wiley-Blackwell.
- Miles P. W. and Oertli J. J. 1993. The significance of antioxidants in the aphid plant interaction: the redox hypothesis. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 67: 275–283
- Miles, P. W. 1999. Aphid Saliva. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 74: 41–85
- Nicholson, S. J., Hartso, S. D. and Puterka, G. J. 2012. Proteomic analysis of secreted saliva from Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Kurd.) biotypes that differ in virulence to wheat. *Journal of Proteomics* 75: 2252–2268.
- Pan, Y., Zhu, J., Luo, L., Kang, L. and Cui, F. 2015. High expression of a unique aphid protein in the salivary glands of *Acyrtosiphon pisum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 92: 175–180.
- Pauwels, L, Inzé D and Goossens, A. 2009. Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci.* 14: 87–91.
- Pitino, M. and Hogenhout, S. A. 2013. Aphid Protein Effectors Promote Aphid Colonization in a Plant Species-Specific Manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 130–139.

- Pollini, A. 1998. Manuale di entomologia applicata. Edagricole, Bologna, 1462 pp.
- Ponzio, C., Cascone, P., Cusumano, A., Weldegergis, B. T., Fatouros, N. E., Guerrieri, E., Dicke, M. and Gols, R. 2016. Volatile-mediated foraging behaviour of three parasitoid species under conditions of dual insect herbivore attack. *Animal Behaviour* 111: 197-206
- Powell, G., Tosh, C.R., Hardie, J. 2006. Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annual Review of Entomology* 51: 309–330
- Prado, E. and Tjallingii, W. F. 1997. Effects of previous plant infestation on sieve element acceptance by two aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2: 189-200.
- Rakwal, R., Agrawal, G. K., Jwa N. S. 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene* 263: 189-198
- Rao, S. A. K., Carolan, J. C., Wilkinson, T. L. 2013. Proteomic Profiling of Cereal Aphid Saliva Reveals Both Ubiquitous and Adaptive Secreted Proteins. *PLoS ONE* 8(2): e57413. doi:10.1371/journal.pone.0057413
- Rebijith, K. B., Asokan, R., Krishna Kumar, N. K., Krishna, V., Chaitany, B. N. and Ramamurthy, V. V. 2013. DNA barcoding and elucidation of cryptic aphid species (Hemiptera: *Aphididae*) in India. *Bulletin of Entomological Research* 103: 601-610
- Regione Campania. 2016. Prodotti tradizionali. Zucchini San Pasquale. <http://www.agricoltura.regione.campania.it/tipici/tradizionali-vegetali.htm>
- Ribeiro, A. P. O., Pereira, E. J. G., Galvan, T. L., Picanco, M. C., Picoli, E. A. T., et al. 2006. Effect of eggplant transformed with oryzacystatin gene on *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Applied Entomology* 130: 84-90
- Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* 10: 3321–3338
- Rongai, D. and Cerato, C. (2001). Manuale per il riconoscimento degli afidi. Editore: Ist. Colture Industriali

- Rose, O. C., Brookes, M. I. and Mallet, J.L.B. 1994. A quick and simple nonlethal method for extracting DNA from butterfly wing. *Mol Ecol* 3:275.
- Salvaudon, L., De Moraes, C. M. and Mescher, M. C. 2013. Outcomes of co-infection by two potyviruses: implications for the evolution of manipulative strategies. *Proceedings of the Royal Society London B*. 280: 20122959. Doi:/10.1098/rspb.2012.2959
- Sauge, M., H., Lambert, P. and Pascal, T. 2012. Co-localisation of host plant resistance QTLs affecting the performance and feeding behaviour of the aphid *Myzus persicae* in the peach tree. *Heredity* 108: 292–301.
- Smith, C. M. and Boyko, E. V. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 1–16.
- Stroyan, H. L. G. 1984. Aphids-Pterocommatinae and Aphidina (Aphidini). *Handbooks for the Identification of British Insects, Volume 2, Part 6*, Royal Entomological Society of London, London, UK:1–232.
- Takemoto, H., Uefune, M., Ozawa, R., Arimura, G. and Takabayashi, J. 2013. Previous infestation of pea aphids *Acyrtosiphon pisum* on broad bean plants resulted in the increased performance of conspecific nymphs on the plants. *Journal of Plant Interactions* 4: 370-374.
- Tamayo, M. C., Rufat, M., Bravo, J. M. and San Segundo, B. 2000. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211: 62–71.
- Thaler, J. S., Stout, M. J., Karban, R. and Duffey, S. S. 2001. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecology Entomology* 26: 312–324
- Tjallingii, W. F. 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. In: A.K. Minks and P. Harrewijn (Editors), *Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control*, Volume B. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. pp. 95-108.
- Tjallingii, W. F. 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* 4: 739–745. doi:10.1093
- Tremblay, E. 1981. *Entomologia applicata*. Volume II parte I. Liguori Editore, Napoli, 407 pp.

- Tremblay, E. 2003. Entomologia applicata. Volume I. Generalità e mezzi di controllo. Liguori Editore, Napoli, 269 pp.
- Truitt, C. L., Wei, H. X. and Pare, P. W. 2004. A Plasma Membrane Protein from *Zea mays* Binds with the Herbivore Elicitor Volicitin. *The Plant Cell* 16: 523–532
- Turlings, T. C. J. and Benrey, B. 1998. Effects of plant metabolites on the behavior and development of parasitic wasps. *Eco-Science* 5: 321–33
- Turlings T. C. J., McCall P. J., Alborn H. T. and Tumlinson J. H. 1993. An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology* 19: 411–425
- van Bel A. J. E. and Will, T. 2016. Functional Evaluation of Proteins in Watery and Gel Saliva of Aphids. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1840. doi: 10.3389
- Vandermoten, S., Harmel, N., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Haubruge, E. and Francis, F. 2014. Comparative analyses of salivary proteins from three aphid species. *Insect Molecular Biology* 23: 67-77.
- Van Poecke, R. M. P. and Dicke, M. 2004. Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biology* 6: 387–401
- Wackers F. L., Zuber D., Wunderlin R., Keller F. 2001. The effect of herbivory on temporal and spatial dynamics of foliar nectar production in cotton and castor. *Annals of Botany* 87: 365–370
- Walling, L. L. 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 2: 195:216
- Walling, L. L. 2009. Adaptive Defense Responses to Pathogens and Insects. *Advances in Botanical Research* 51: 551-612
- Wang, J.F., Jiang, L.Y. and Qia, G.X. 2011. Use of mitochondrial COI sequence to identify species of the subtribe Aphidina. *ZooKeys* 122: 1–17.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S. and Sharma H. C. 2012. Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. *Plant Signaling & Behavior* 7: 1306-1320.
- Wasternack, C. and Hause, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111: 1021–1058.

- Will, T., Tjallingii, W. F., Thonnessen A. and Van Bel, A. J. E. 2007. Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *PNAS* 104: 10536–10541
- Will, T., Steckbauer, K., Hardt, M., and van Bel, A. J. E. 2012. Aphid gel saliva: Sheath structure, protein composition and secretory dependence on stylet-tip milieu. *PLoS ONE* 7(10): e46903. doi:10.1371/journal.pone.0046903
- Will, T., Furch, A. C. U. and Zimmermann, M. R. 2013. How phloem feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. *Frontiers in plant science* 336: 1-12 doi: 10.3389
- Wu, J., Luo X., Guo, H., Xiao J. and Tian Y. 2006. Transgenic cotton, expressing *Amaranthus caudatus* agglutinin, confers enhanced resistance to aphids. *Plant Breeding* 125: 390-394
- Xu, L., Duan, X., Lv, Y., Zhang, X., Nie, Z., Xie, C., Ni, Z. and Liang, R. 2014. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. *Transgenic Res* 23: 389–396.
- Yip, L., Patton, J. J. and Christopher, M. E. 2000. Polyphenol Oxidase from Hybrid Poplar. Cloning and Expression in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiology* 1: 285-296
- Zhao , L. Y., Chen, J. L., D.F. Cheng, D. F., Sun, J. R., Liu, Y. and Tian, Z. 2009. Biochemical and molecular characterizations of *Sitobion avenae* induced wheat defense responses. *Crop Protection* 28: 435–442
- Zhu-Salzman K., Shade R. E., Koiwa H., Salzman R. A., Narasimhan M., Bressan I. A., Hasegawa P. M. and Murdock L. L. 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *PNAS* 95: 15123–15128

## ***RINGRAZIAMENTI***

*Desidero ringraziare tutti coloro che hanno fornito il loro prezioso apporto al mio lavoro di ricerca.*

*Ringrazio la Prof.ssa Rosa Rao, il Dr. Andrea Becchimanzi e le Dr.sse Mariangela Coppola, Ilaria Di Lelio, Paola Varricchio e Alessia Vitiello per il fondamentale contributo e l'indispensabile aiuto.*

*Ringrazio ancora tutto il personale del CNR-IPSP di Portici che in questi anni mi ha supportato e sopportato, donandomi sostegno morale e materiale, chi con consigli e suggerimenti, chi con parole di incoraggiamento. In particolare, desidero ringraziare il Dr. Giuseppe Parrella per l'ineguagliabile contributo professionale, le Dr.sse Michelina Ruocco, Annalisa Cozzolino, Elisa Troiano per la preziosa collaborazione ed i Dr. Maria Maurilia Monti e Paolo Pedata per le rassicurazioni ed i consigli.*

*Ringrazio Lorenzo Marrazzo per l'aiuto nella gestione degli allevamenti.*